Kreatininbestimmung im Serum und Harn mit einem Enzym-Jaffé-Farbtest im Mikromaßstab

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gisela Löhberg
aus Münster

1981

81 183

Kreatininbestimmung im Serum und Harn mit einem Enzym-Jaffé-Farbtest im Mikromaßstab

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gisela Löhberg
aus Münster

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 15.Mai 1981
Dekan: Prof. Dr. E. Reinhard
1. Berichterstatter: Prof. Dr. K.-A. Kovar
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Auterhoff

Die vorliegende Arbeit wurde im Mai 1978 unter Anleitung von Prof.Dr.K.-A.Kovar am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im Januar 1981 abgeschlossen.

Für die wertvollen Anregungen und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit danke ich Herrn Professor Dr.K.-A.Kovar sehr herzlich.

Herrn Dr.med.E.Henkel, Oberarzt am Oststadt-Krankenhaus Hannover, danke ich für das Probenmaterial und seine Unterstützung beim statistischen Methodenvergleich sehr herzlich.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Entwicklung eines Enzym-Jaffé-Farbtests im Mikromaßstab	4
2.1.	Zur Farbstoffausbildung bei der Jaffé-Reaktion	4
2.2.	Übersicht enzymatischer Bestimmungsmethoden	8
2.3.	Störung durch Kreatin	14
2.4.	Erstellen einer Arbeitsvorschrift	34
	Arbeitsvorschrift	42
2.5.	Prüfung der Methode	43
	Linearität	43
	Störungen	48
	Richtigkeit	50
	Präzision	53
2.6.	Vergleich mit anderen enzymatischen Verfahren	56
3.	Statistischer Methodenvergleich	57
3.1.	Kurze Darstellung der Methoden	57
3.2.	Durchführung der Vergleichsversuche	59
3.3.	Auswertung	65
4.	Ausarbeitung einer DIN-Vorschrift	76
4.1.	Beurteilung des DIN-Entwurfes 58 973	76
4.2.	Kombination der Fullererde-Methode mit dem optimierten Jaffé-Farbtest	79
4.3.	DIN-Entwurf mit dem entwickelten Enzym-Jaffé-Farbtest	83
5.	Bestimmung von Kreatinin im Urin	90
5.1.	Anwendung des optimierten Jaffé-Farbtests	90
5.2.	Methodenvergleich	93
6.	Zusammenfassung	97
7.	Literaturverzeichnis	100

Kreatininbestimmung im Serum und Harn mit einem Enzym-Jaffé-Farbtest im Mikromaßstab

1. Einleitung

Die Kreatininbestimmung im Serum gilt in der klinischen Chemie als der wichtigste Suchtest auf eine eingeschränkte Nierenfunktion: Die Plasmakonzentration des Kreatinins hängt in erster Linie von der glomerulären Filtration ab, eine Verminderung führt zu erhöhten Kreatininwerten[1,2].
Die Bestimmung von Kreatinin im Urin wird zur Kontrolle der Vollständigkeit von 24-Stunden-Urinsammlungen herangezogen, denn die Kreatininausscheidung pro kg Körpergewicht ist während 24 Stunden in der Regel konstant. Sie kann vermindert sein bei stark eingeschränkter Nierenfunktion oder bei reduzierter Muskelmasse[2].
Für den Normalbereich des Kreatiningehaltes im Serum besteht eine signifikante Geschlechtsabhängigkeit[3]. Sie wird mit der unterschiedlich großen Muskelmasse von Männern und Frauen begründet[4]. Als Normalwerte für die Kreatininkonzentration im Serum werden angegeben[5]:

	mg/100 ml	µmol/l
Männer	0,55-1,10	49-97
Frauen	0,47-0,90	42-80

Ein anderer Indikator für die Nierenfunktion ist der Harnstoffgehalt des Serums. Meistens bevorzugt man aber die Bestimmung des Kreatinins, denn sie bietet zwei diagnostische Vorteile. Sie ist einmal von der Eiweißzufuhr weitgehend unabhängig, zum anderen steigen bei einer Funktionseinschränkung die Werte des Serumkreatinins etwa doppelt so schnell an wie die des Serumharnstoffes, d.h. eine Nephropathie kann früher erkannt werden[6].
Die meisten Verfahren zur routinemäßigen Kreatininbestimmung beruhen auf der Jaffé-Methode[7]. Kreatinin bildet mit

alkalischer Pikratlösung einen orange-roten Farbstoff aus, dessen Extinktion zur quantitativen Auswertung herangezogen wird. Die Reaktion ist aber sehr unspezifisch, denn man erfaßt dabei außer dem Kreatinin auch zahlreiche im Serum enthaltene Chromogene, in der Literatur werden etwa 50 beschrieben[2], und mißt das sog. "Gesamtkreatinin". Es gibt u.a. folgende Möglichkeiten, diese Störeinflüsse auszuschalten: Adsorption des Kreatinins an Fullererde (Lloyd's Reagens)[8,9], Vorschaltung einer Dialyse[10,11], kinetische Verfahren[12,13,14,15]. Die meisten Verfahren konnten sich in der Praxis nicht durchsetzen, denn sie erfordern einen großen technischen und zeitlichen Aufwand.

Der Mechanismus der Jaffé-Reaktion wurde von K.-A.Kovar, A.Ellinger und R.Seidel 1976 untersucht[16]. Darauf aufbauend gelang es 1978 M.Schmid, durch Optimierung der Reaktionsbedingungen den Jaffé-Test empfindlicher zu gestalten[17]. Der störende Einfluß von Chromogenen ließ sich durch Kopplung der Farbreaktion mit der enzymatischen Umwandlung von Kreatinin zu Kreatin durch Creatinin-Amidohydrolase ausschalten. Da Kreatinin unter den gewählten Bedingungen kein Jaffé-Reaktionsprodukt gibt, entspricht die Extinktionsdifferenz eines Ansatzes mit und ohne Enzym direkt der Kreatininkonzentration.

Bei vergleichenden Bestimmungen des Kreatiningehaltes in Humanseren konnte keine Übereinstimmung zwischen dem neu entwickelten Test und anderen gebräuchlichen Methoden festgestellt werden. So war es das erste Ziel der vorliegenden Arbeit, die Ursachen dieser Diskrepanz aufzuklären und das Verfahren zu verbessern.

Für die Anwendbarkeit einer Methode in der Praxis spielt die benötigte Serummenge eine Rolle, denn die Belastung des Patienten durch die Blutentnahme soll möglichst klein gehalten werden. Nicht immer stehen die für die Vorschrift nach Schmid erforderlichen 1000 µl Serum zur Verfügung. Daraus ergab sich die Aufgabe, einen Ansatz im Mikromaßstab zu entwickeln. Die Korrelation des verbesserten Enzym-Jaffé-Farbtestes zu anderen Methoden war zu prüfen. Ferner sollte untersucht werden, ob sich das Verfahren für Kreatininbestimmungen im Urin eignet.

Seit 1975 wird durch den Normenausschuß Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V. eine DIN-Vorschrift erarbeitet, die im Oktober 1979 unter DIN 58 973 als Entwurf herauskam[18]. Das vorgeschlagene Verfahren basiert auf der Fullererde-Methode[8,9,19]. Aufgrund der Vorarbeiten von M.Schmid sollte der Entwurf überarbeitet bzw. neu konzipiert werden.

2. Entwicklung eines neuen Enzym-Jaffé-Farbtestes im Mikromaßstab

2.1. Zur Farbstoffausbildung bei der Jaffé-Reaktion

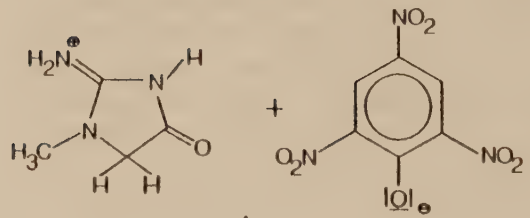
Die der Kreatininbestimmung zugrunde liegende Jaffé-Reaktion hat folgenden Reaktionsmechanismus[16]:

(1) Kreatinin + OH^- $\rightleftharpoons$ Kreatininanion + H_2O

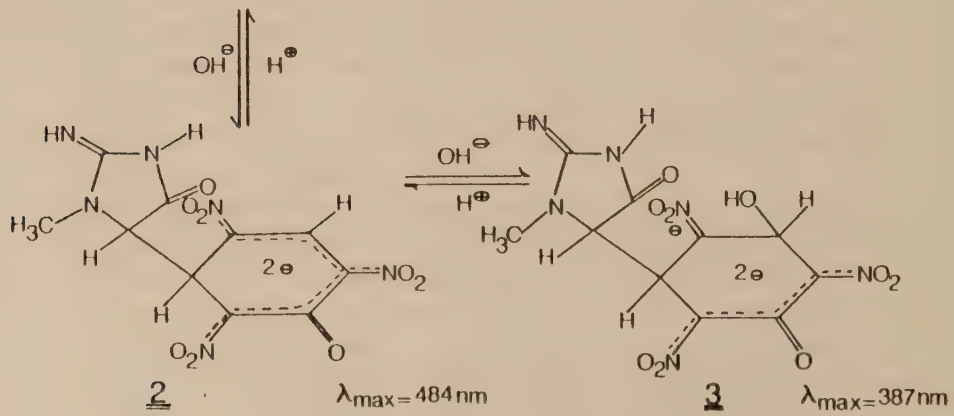
(2) Pikrinsäure + OH^- $\rightleftharpoons$ Pikratanion + H_2O

(3) Kreatininanion + Pikratanion $\rightleftharpoons$ Meisenheimer-Addukt 2 (Trinitrocyclohexadienataddukt)

(4) Meisenheimer-Addukt 2 + OH^- $\rightleftharpoons$ Propenid-Addukt 3



1



2 λ_{max} = 484 nm

3 λ_{max} = 387 nm

Schema 1: Reaktionsmechanismus der Jaffé-Reaktion

Die Lage des Gleichgewichtes (4) ist stark pH-abhängig, und die Verbindungen 2 und 3 absorbieren bei unterschiedlichen Wellenlängen. Bei pH 11 - 12 (Verbindung 2) liegt das Absorptionsmaximum bei 484 nm, bei pH 14 bei 387 nm (3)[17]. Um die Empfindlichkeit der Jaffé-Reaktion zu steigern, erscheint es günstig, das Gleichgewicht zwischen 2 und 3 möglichst weit nach 2 zu verschieben. Dadurch erhöht sich die Extinktion bei 484 nm. Daraus ergibt sich aber die Schwierigkeit, daß bei pH 11 - 12 die Reaktion sehr langsam abläuft, begründbar damit, daß das Gleichgewicht (3) der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Farbstoffausbildung ist. Eine Reaktionszeit von mehreren Stunden ist aber für einen in der Praxis anwendbaren Test nicht geeignet.
Schmid löste das Problem dadurch, daß er die Reaktion zunächst im stark alkalischen Milieu startet. Das bewirkt die schnelle Ausbildung des Propenid-Adduktes (3). Ein anschließendes Absenken des pH-Wertes durch Zugabe von Natriumdihydrogenphosphatlösung führt zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten des Meisenheimer-Adduktes 2. Dieser Schritt ist mit einem sprunghaften Anstieg der Extinktion verbunden (Abb.1).

Erläuterungen zu Abb.1:

1): 0,5 ml Kreatininlösung
0,5 ml Pikrinsäurelösung
1,0 ml Natronlauge 1N

2): wie 1), nach 10 Minuten Zugabe von
1,0 ml NaH_2PO_4-Lösung, dadurch Absenken des pH-Wertes auf 11,5.

3): 0,5 ml Kreatininlösung
0,5 ml Pikrinsäurelösung
1,0 ml NaH_2PO_4-Lösung
1,0 ml Natronlauge 1N
pH 11,5

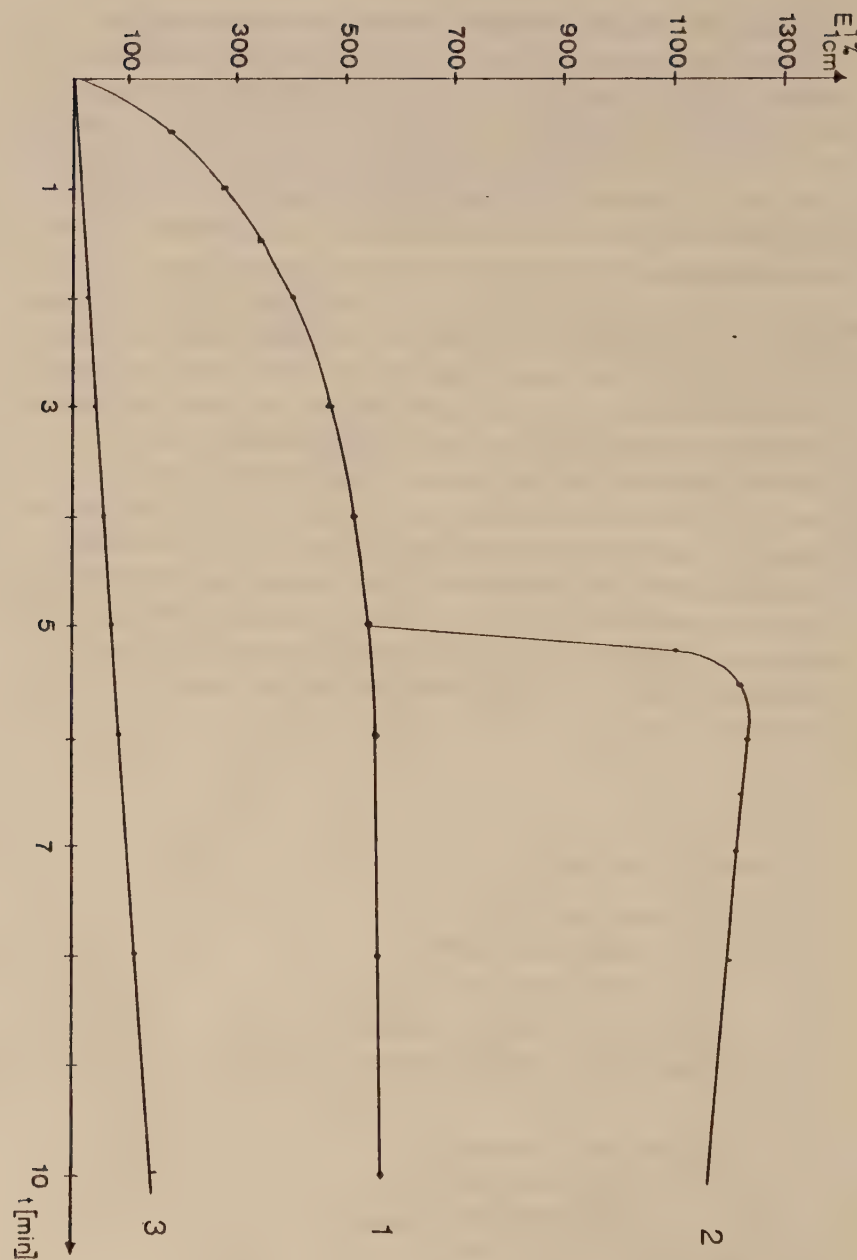


Abb.1 Spezifische Extinktion in Abhängigkeit von der Zeit bei verschiedenen Reaktionsbedingungen

Wie aus Abb.1 hervorgeht, bleibt die Extinktion nach Zugabe der NaH_2PO_4-Lösung nicht konstant, sondern man beobachtet eine langsame Abnahme (Kurve 2), nachdem zuvor unmittelbar nach Absenken des pH-Wertes das Maximum erreicht worden ist. Das kann dadurch erklärt werden, daß in (4) bei pH 11,5 die Bildung des Meisenheimer-Adduktes $\underline{\underline{2}}$ bevorzugt ist, welches nach (3) wiederum mit Kreatininpikrat $\underline{\underline{1}}$ im Gleichgewicht steht, d.h. mit zunehmender Bildung von $\underline{\underline{1}}$ nimmt die gemessene Extinktion ab.

Der Anstieg von Kurve 3 verläuft wesentlich langsamer, denn die Bildung des Meisenheimer-Adduktes $\underline{\underline{2}}$ setzt voraus, daß Kreatinin- und Pikratanionen vorhanden sind. Diese entstehen bei pH 11,5 langsamer als im stark alkalischen Milieu, die Gleichgewichtseinstellung (3) wird dadurch verzögert.

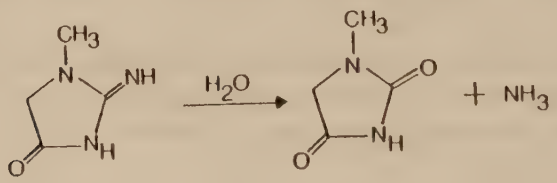
Nach etwa 4 Stunden treffen sich die Kurven 2 und 3 ($E^{1\%}_{1cm} \approx 690$), d.h. beide Proben haben nach dieser Zeit dieselbe Gleichgewichtseinstellung erreicht.

2.2. Enzymatische Methoden zur quantitativen Bestimmung von Kreatinin

Als spezifisch für die Bestimmung von Kreatinin gelten enzymatische Methoden. Dabei erfolgt ein selektiver Abbau des Kreatinins durch ein geeignetes Enzym, die quantitative Auswertung beruht auf einer Farbreaktion oder auf der Messung eines Abbauproduktes. In der Literatur werden folgende Enzyme beschrieben[20]:

Creatininase (EC 3.5.4.-)

Creatininase katalysiert den Abbau des Kreatinins zu N-Methylhydantoin und Ammoniak.

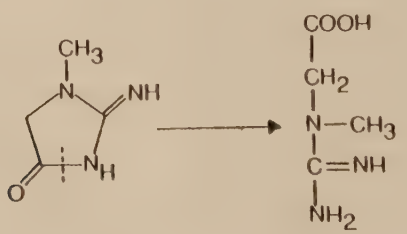


Kreatinin
(2-Imino-1-methyl-
4-imidazolidinon)

N-Methylhydantoin

Creatininhydrolase oder Creatininamidohydrolase (EC 3.5.2.-)

Creatininamidohydrolase bewirkt die Spaltung von Kreatinin zu Kreatin.



Kreatinin

Kreatin

Kurze Beschreibung einiger enzymatischer Methoden

Miller und Dubos[21,22,23,24)]

Das älteste enzymatische Verfahren geht auf Miller und Dubos zurück. Das Kreatinin wird durch eine "Creatininase" (Gemisch aus Creatininase und Creatininamidohydrolase) abgebaut, die quantitative Auswertung erfolgt durch Jaffé-Reaktion vor und nach Enzymeinwirkung bzw. mit Hilfe von Dinitrobenzoesäure. Die Methode eignet sich wegen der aufwendigen Gewinnung von Extrakten aus Creatininase produzierenden Bakterienkulturen nicht für routinemäßige Bestimmungen im klinischen Labor.

Mc Lean, Gallwas, Hendrixson[25)]

Das Verfahren beruht auf der Spaltung des Kreatinins mittels Creatininase (EC 3.5.4.-) zu N-Methylhydantoin und Ammoniak und einer Bestimmung des Kreatiningehaltes durch eine Jaffé-Reaktion vor und nach Enzymeinwirkung. Es wird mit einem Analysenapparat gearbeitet.

Serumbedarf: 2x25 = 50/ul
Zeit: ca. 30 Minuten

Thompson, Rechnitz[26)]

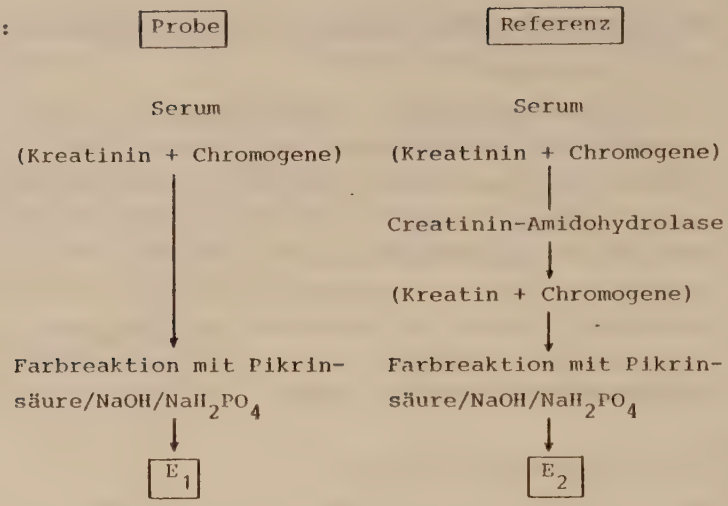
Kreatinin wird durch Creatininase (EC 3.5.4.-) zu N-Methylhydantoin und Ammoniak abgebaut, die quantitative Auswertung erfolgt durch Bestimmung des gebildeten Ammoniaks mit Hilfe einer handelsüblichen Membranelektrode.

Schmid[17)]

Kreatinin wird zu Kreatin abgebaut mittels Creatinin-Amidohydrolase (EC 3.5.2.-), anschließend erfolgt eine quantitative Bestimmung des Kreatinins mit einer modifizierten Jaffé-Reaktion in Proben mit und ohne Enzymbehandlung. Dieses Verfahren verbindet die Spezifität enzymatischer Methoden mit der großen Meßempfindlichkeit der Jaffé-Reaktion.

Serumbedarf: 2x500 = 1000/ul
Zeit: 17 Minuten (ohne Probenvorbereitung)

Prinzip:



Arbeitsvorschrift für den enzymatischen Farbtest nach Schmid:

	Probe	Probenleerwert
wäßrige Kreatininlösung bzw. Serum	0,5 ml	0,5 ml
Enzymlösung 5 mg Creatininase/ml Glycerin 50%	-	0,02 ml
Glycerin 50%	0,02 ml	-
Inkubationszeit 10 min bei 30°C		
Pikrinsäurelösung 14 mmol/l	0,5 ml	0,5 ml
1 M-Natronlauge	1,0 ml	1,0 ml
Inkubationszeit 5 min bei 30°C		
NaH_2PO_4-Lösung 9%	1,0 ml	1,0 ml
Messung der Extinktion der Probe gegen den Probenleerwert nach 2 min bei 484 nm (Meßtemperatur 30°C)		

Vollenzymatische Verfahren

Die vollenzymatischen Verfahren gehen auf Wahlefeld et.al. zurück[27,28,29]. Die Methode beruht auf der spezifischen, quantitativen Umwandlung von Kreatinin in Kreatin mit Hilfe des Enzyms Creatinin-Amidohydrolase (EC 3.5.2.-) und nachfolgender enzymatischer Bestimmung des gebildeten Kreatins. Die NADH-Abnahme, gemessen an der Extinktionsänderung bei 340 nm, 334 nm oder 365 nm, ist der Kreatininmenge direkt proportional.

Serumbedarf: 500 µl

Zeit: 30 Minuten

Vorteil des Verfahrens: hohe Spezifität

Nachteile des Verfahrens: es sind Halbmikro-Quarzküvetten oder Absaugküvetten erforderlich, hohe Kosten pro Analyse, große Serummenge und recht hoher Zeitaufwand pro Analyse.

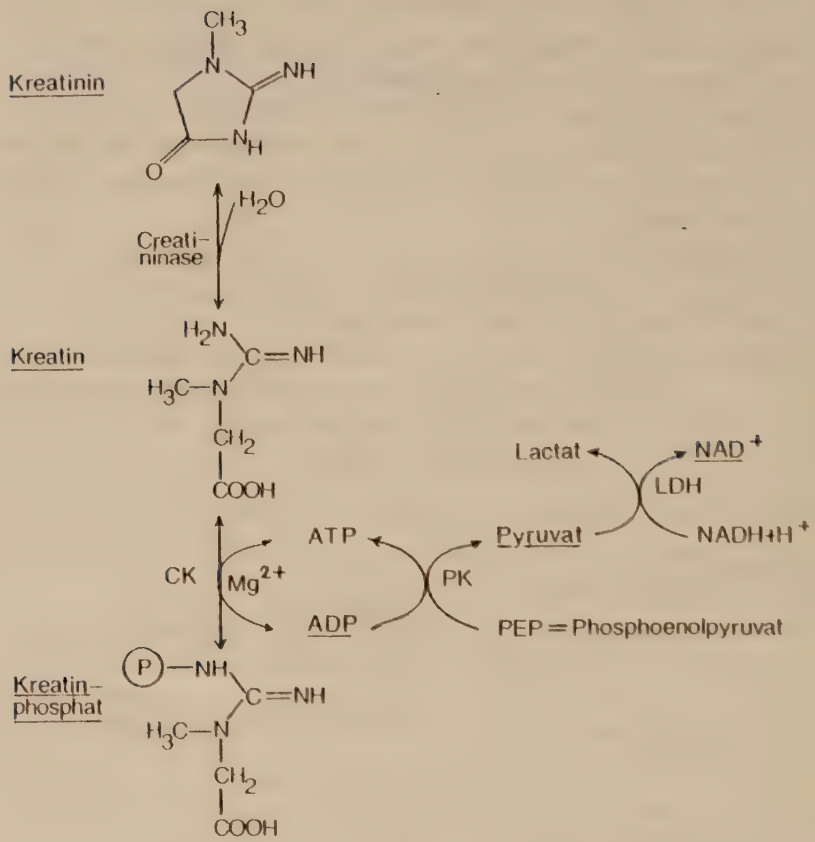
Prinzip[27]:

$$\text{Kreatinin} + H_2O \xrightleftharpoons[\text{Amidohydrolase}]{\text{Creatinin-}} \text{Kreatin}$$

$$\text{Kreatin} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{Creatin-Kinase}} \text{Kreatinphosphat} + \text{ADP}$$

$$\text{ADP} + \text{PEP} \xrightarrow{\text{Pyruvat-Kinase}} \text{ATP} + \text{Pyruvat}$$

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Lactat} + NAD^+$$



Schema 2 Prinzip der vollenzymatischen Bestimmung von Kreatinin

Creatininase	= Creatininamidohydrolase	(EC 3.5.2.-)
CK	= Creatinkinase	(EC 2.7.3.2)
PK	= Pyruvatkinase	(EC 2.7.1.40)
LDH	= Lactatdehydrogenase	(EC 1.1.1.27)

Weiterentwicklung der vollenzymatischen Methode

Moss, Bondar und Buzzelli[20] schlagen ein kinetisches Verfahren vor, das auf der Wahlefeld-Methode basiert, aber den Vorteil erheblicher Einsparungen an Zeit und Probenmaterial bietet. Zunächst wird das im Serum bereits vorhandene Kreatin enzymatisch abgebaut (Creatin-Kinase, Pyruvat-Kinase, Lactat-Dehydrogenase, vergl. Methode Wahlefeld) und E_1 gemessen. Nach Zugabe von Creatinin-Amidohydrolase und Inkubation wird E_2 gemessen, die Extinktionsdifferenz entspricht der NADH-Abnahme und ist direkt der Kreatininmenge im Probenmaterial proportional. Der Zeitgewinn beruht darauf, daß es sich im Gegensatz zur Methode Wahlefeld nicht um eine Endpunktsbestimmung handelt.

Serumbedarf: 250 µl
Zeit: ca. 10 Minuten.

Szasz[5] überträgt die Wahlefeld-Methode auf einen Analysenautomaten.

Serumbedarf: 200 µl
60 Proben/Stunde.

2.3. Störung durch Kreatin

Ausgangspunkt der Untersuchungen sind folgende Beobachtungen:
1.) Schmid fand keine Übereinstimmung seiner Methode mit anderen gebräuchlichen Verfahren, überprüft wurde die Korrelation zu Methode Autoanalyzer, Methode Merck und einer modifizierten Methode Merck. Eine Verschiebung der Kreatininwerte nach unten entspricht den Erwartungen, denn bei den Vergleichsmethoden wird der Einfluß der Chromogene nicht vollständig ausgeschlossen. Damit kann aber nicht die fehlende Korrelation erklärt werden. Mit einer theoretisch möglichen Enzymhemmung durch Medikamente ließ sie sich nicht begründen, wie Zumischversuche definierter Kreatininmengen ergeben haben (Wiederfindungsrate 99-102%). Ferner konnte von Schmid nicht geklärt werden, warum im Serum mancher Patienten mit dem von ihm entwickelten Farbtest kein Kreatinin gefunden wurde.
2.) Der Kreatiningehalt im Serum gilt als ziemlich konstant[6,30]. Deswegen war es überraschend, daß die Kreatininwerte im Serum gesunder Probanden innerhalb von 14 Stunden um ca. ± 20% schwankten[+], das entspricht in etwa dem 2S-Bereich um den mittleren Normwert des Serumkreatinins[30]. Eine Enzymhemmung als Ursache der Schwankungen ist nach den Untersuchungen von Schmid nicht zu erwarten, mögliche Störungen der Farbreaktion durch Chromogene werden durch den Probenleerwert ausgeschaltet.

[+] Nach Angaben von E.Henkel schwankt der Kreatiningehalt des Serums während eines Tages höchstens um ± 5%.

Tab.1: Schwankung des Serumkreatiningehaltes bei Bestimmung nach Methode Schmid.

Proband	Kreatinin(in mg)gefunden zur Zeit								
	0 h	2 h	3 h	6 h	14 h	Ver-gleich	Mittel-wert	Min.	Max.
1	0,55	0,49	0,53	0,69	0,56	0,91	0,564	86,9%	122,3%
2	0,88	0,73	0,75	1,15	0,86	0,78	0,874	83,5%	131,6%
3	0,93	0,95	1,06	1,08	1,09	0,85	1,022	91,2%	106,7%
4	1,06	0,82	0,86	1,03	0,83	0,94	0,92	89,1%	115,2%
5	0,81	0,70	0,88	1,07	0,84	0,81	0,86	81,4%	124,4%
6	0,81	0,93	0,81	0,92	0,98	0,87	0,89	91,0%	107,7%
7	0,75	0,99	1,08	0,91	0,84	0,91	0,914	82,1	118,2%

Anmerkungen:

0 h: Wert vor dem Frühstück
Durchführung aller Bestimmungen nach Methode Schmid,
Ansatz 100/ul (S.18)
Vergleich: gemessen nach Methode Boehringer im Leerwert (0 h)
Min.: niedrigster Wert, bezogen auf den Mittelwert
Max.: höchster Wert, bezogen auf den Mittelwert

$\bar{x}_{Min}$ = 86,5% mittlerer niedrigster Wert in % des Mittelwertes.

$\bar{x}_{Max}$ = 118,0% mittlerer höchster Wert in % des Mittelwertes.

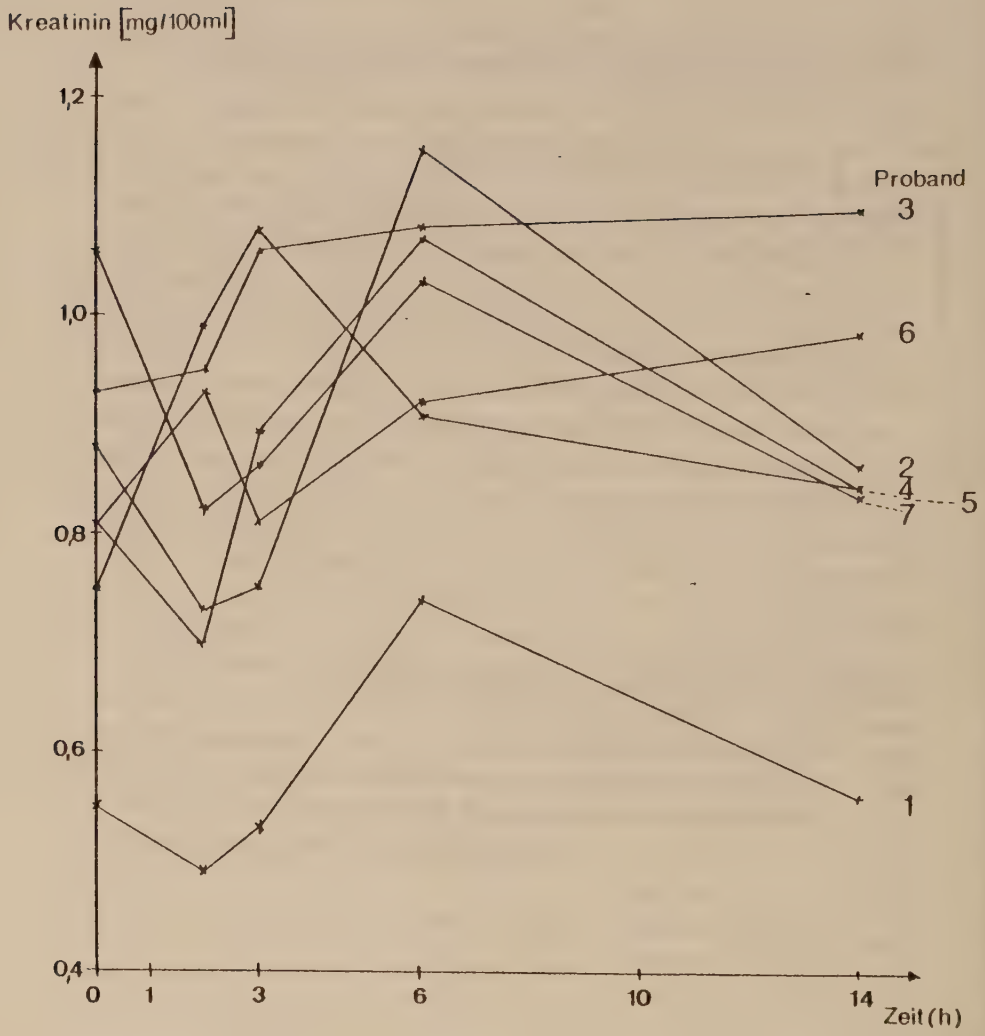


Abb.2 Kreatininkonzentration im Serum in Abhängigkeit von der Zeit bei 7 Probanden, Durchführung der Messungen nach Methode Schmid

Einfluß von Creatinin-Amidohydrolase auf Kreatinin und Kreatin

Creatinin-Amidohydrolase (EC 3.5.2.-), im folgenden Text kurz als "Creatininase" bezeichnet, wird in der Methode nach Schmid zum Abbau des Kreatinins eingesetzt. Es findet eine Gleichgewichtseinstellung statt zwischen Kreatinin und Kreatin. Schmid bestimmte die Gleichgewichtskonstante des enzymatischen Abbaus in wäßriger Lösung und in Phosphat-Puffer mit pH 7,4, das entspricht dem pH-Wert des Serums, bei einer Reaktionstemperatur von 30°C übereinstimmend mit

$$K_{H_2O} = \frac{[\text{Kreatin}]}{[\text{Kreatinin}]} = 1{,}565 \qquad 17)$$

Das entspricht einem Restgehalt von 39% Kreatinin im Reaktionsansatz. Da die Abbaurate konstant ist, ist mit Hilfe einer Eichgerade eine quantitative Auswertung möglich. Das gilt allerdings nur für Bestimmungen in kreatinfreien Kreatininlösungen und im Urin (Kreatin wird bei gesunden Personen nicht mit dem Urin ausgeschieden, es unterliegt praktisch vollständig der tubulären Rückresorption in der Niere[2]. Plasma enthält dagegen Kreatin in wechselnder Menge. Seine Konzentration hängt von seiner Bildungsrate, der Aufnahme in den Muskel, der Speicherung im Muskel und seiner Rückresorption in der Niere ab[2]. Angaben zum Kreatingehalt im Serum und Plasma sind in der Literatur sehr unterschiedlich, eine untere Grenze wird häufig nicht angegeben.

Kreatin in Serum und Plasma: 0,3-0,7 mg/100ml ≙ 20,12-46,94 µmol/l[31]

Bei der Methode Schmid ist keine enzymatische Folgereaktion nachgeschaltet, die das bereits vorhandene und das durch den Abbau gebildete Kreatin weiter umsetzt. Deswegen ist zunächst zu erwarten, daß das bereits vorhandene Kreatin in die Gleichgewichtseinstellung Kreatinin-Kreatin eingreift. Wie die Untersuchungsergebnisse zeigen, führt das Kreatin aber nicht nur zu einem verminderten Abbau des Kreatinins durch vorzeitiges Erreichen des Gleichgewichts, sondern es wird auch selbst zu Kreatinin umgesetzt.

Übertragung der Methode Schmid auf einen Mikroansatz

Da alle folgenden Bestimmungen im Mikromaßstab durchgeführt wurden, soll zunächst die Übertragung der Methode Schmid auf ein geringeres Probenvolumen beschrieben werden. Folgender Ansatz wurde ausgearbeitet:

	Probe (/ul)	Referenz (/ul)
wäßr.Kreatinin-lösung, Serum	100	100
Creatininase	-	5
Glycerin 3,5%	5	-
Inkubationszeit 10 Minuten bei 30°C		
Pikrinsäurelsg. 14 mmol/l	100	100
Natronlauge 1N	200	200
Inkubationszeit 5 Minuten bei 30°C		
Natriumdihydrogen-phosphatlsg. 9%	200	200
nach 2 Minuten Messung bei 484 nm/30°C		

Alle Messungen wurden mit einem Beckman Spektrophotometer Model 24 durchgeführt unter Verwendung von Einmalküvetten.

Im neuen Mikroansatz wird mit 20% der von Schmid verwendeten Volumina gearbeitet, lediglich die Enzym- und die Glycerinmenge sind aus praktischen Gründen nur auf 25% reduziert.

Die Konzentration der wäßrigen Glycerinlösung ist von 50% auf 3,5% gesenkt worden. Bei Einsatz der 50%igen Glycerinlösung beträgt die Extinktion der Blindlösung (0 mg Kreatinin) E = 0,040 im Gegensatz zu den Ergebnissen von Schmid. Dieser Fehler läßt sich durch Herabsetzen der Glycerinkonzentration beheben. Vermutlich ist die Zusammensetzung der Enzymlösung geändert worden, Herstellerangaben liegen nicht vor.

Eichgerade für wäßrige Kreatininlösungen, bestimmt im Mikroansatz

Tab.2: Meßwerte für wäßrige Kreatininlösungen

Kreatinin (mg/100ml)	Extinktion bei 484 nm
0,00	0,000
0,25	0,033
0,50	0,067
1,00	0,130
2,00	0,260
3,00	0,387
4,00	0,515
6,00	0,757
8,00	1,004
10,00	1,220

Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Bestimmungen angegeben

Auswertung der Eichgeraden:
Die Eichgerade verläuft linear bis zu einer Kreatininkonzentration von 8 mg/100ml (≙ 707,2 µmol/l). Bei höheren Konzentrationen ist eine Verdünnung erforderlich.
Gleichung der Eichgerade: $y = 0{,}125\ x + 0{,}006$

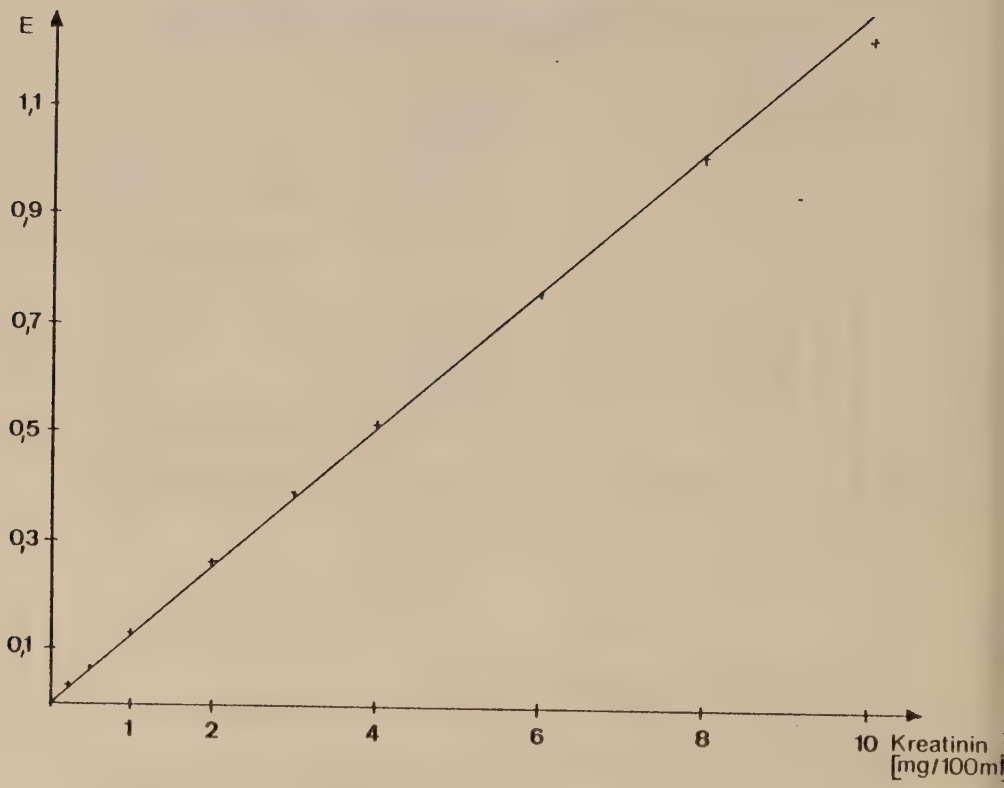


Abb.3 Eichgerade für wäßrige Kreatininlösungen

Eichgerade mit Albuminzusatz, bestimmt im Mikroansatz

Der Mittelwert der Serumalbuminkonzentration wird mit 3,8 - 4,6 g/100 ml (≙ 0,57-0,69 µmol/l) angegeben[2]. Diese Albuminmenge sollte den Kreatininlösungen zugesetzt werden zur Erstellung einer Eichgerade mit "künstlichem Serum".

Durchführung:

1) Herstellen eines Albuminkonzentrates mit 84 mg/ml (≙ 1,254 µmol/l), d.h. mit doppelter Albuminmenge
2) Mischen von gleichen Volumina Albuminkonzentrat und Kreatininlösung zu künstlichem Serum.
   (Dieses Vorgehen gewährleistet eine gleichbleibende Albuminkonzentration in der ganzen Versuchsreihe. Wird Albumin für jede Kreatininkonzentration getrennt eingewogen, kann es zu starken Schwankungen der Meßwerte kommen, bedingt durch Wägefehler).
3) Eine geänderte Reihenfolge der Reagenzienzugabe erscheint zweckmäßig zu sein: Nach Zugabe von Pikrinsäure wurde bei künstlichem Serum gelegentlich eine reversible Trübung beobachtet. Deswegen ist es günstiger, erst die Natronlauge und danach die Pikrinsäure einzupipettieren, damit die Pikrinsäurekonzentration nicht zu hohe Werte erreicht.

Tab.3: Meßwerte der Kreatinin-Albumin-Eichgerade

Kreatinin (mg/100ml)	Extinktion bei 484 nm
0,00	0,002
0,25	0,033
0,50	0,062
1,00	0,120
2,00	0,238
4,00	0,471
6,00	0,688
8,00	0,928
10,00	1,069

Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Bestimmungen angegeben.

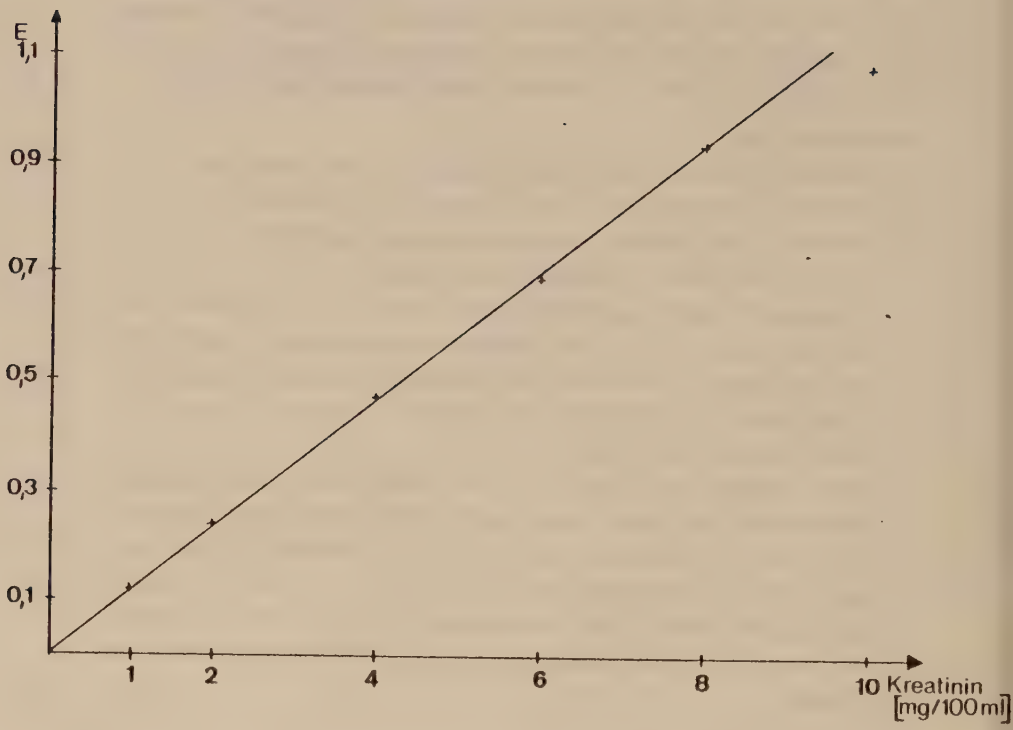


Abb.4 Eichgerade für Kreatininlösungen mit Albuminzusatz

Auswertung:
Die Eichgerade verläuft linear bis zu einer Kreatininkonzentration von 8 mg/100ml (≙ 707,2 µmol/l).
Bei höheren Konzentrationen muß verdünnt werden.
Gleichung der Eichgerade: $y = 0,115\ x + 0,006$

Quantitative Erfassung der Störung durch Kreatin

Kreatin gibt bekanntlich keine Jaffé-Reaktion, das bestätigte auch ein Vorversuch:

Probe:	Kreatinlösung	Referenz:	Wasser
	Pikrinsäure		Pikrinsäure
	Natronlauge		Natronlauge
	Puffer (NaH_2PO_4)		Puffer

Gemessen wurde E = O, Menge und Konzentration der Reagenzien entsprachen dem Mikroansatz.

Unterzieht man eine Kreatininlösung dem enzymatischen Farbtest (d.h. Austausch der Kreatininlösung gegen eine Kreatinlösung), so ist eine deutliche Farbvertiefung auf der Referenzseite zu beobachten. (Um die Extinktionsdifferenz bestimmen zu können, ist ein Austausch von Probe- und Referenzküvette erforderlich). Das bedeutet, daß das Kreatin unter Einwirkung von Creatininase eine Veränderung erfahren haben muß. Das war Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Mit der folgenden Versuchsanordnung soll gezeigt werden, daß Creatininase eine Gleichgewichtseinstellung Kreatinin - Kreatin katalysiert, gleich, ob Kreatinin oder Kreatin als Substrat vorliegt.

Die Versuche werden wegen der besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit molaren anstelle von prozentigen Lösungen von Kreatinin und Kreatin durchgeführt.

100/umol ≙ 1,1312 mg Kreatinin

100/umol ≙ 1,4915 mg Kreatin

Arbeitsvorschrift

Versuch Nr.	Probe	Referenz
1	Kreatin Creatininase	Wasser Glycerin
2	Kreatinin Creatininase	Wasser Glycerin
3	Kreatinin Glycerin	Kreatinin Creatininase
4	Kreatinin Glycerin	Wasser Glycerin
Die eingesetzten Volumina, die übrigen Reagenzien, Reaktionszeiten und Temperatur entsprechen dem Mikroansatz des enzymatischen Farbtestes.		

Versuch 1 und 2 sollen zeigen, daß Creatininase eine Gleichgewichtseinstellung bewirkt zwischen Kreatinin und Kreatin. Bei der Gleichgewichtskonstanten 1,565 (vgl. S. 17) ist zu erwarten, daß die Meßergebnisse 39% der Werte aus Versuch 4 betragen.

Versuch 3 entspricht der üblichen Versuchsanordnung nach dem Mikroansatz. Ein Abbau des Kreatinins zu 61% ist zu erwarten.

Versuch 4 entspricht der Farbstoffausbildung von 100% Kreatinin ohne enzymatischen Abbau. Es ist zu erwarten, daß die Meßergebnisse gleich der Summe der entsprechenden Werte aus Versuch 1 und 3 sowie aus Versuch 2 und 3 sind. Die Messung gegen Wasser dürfte hier wie bei 1 und 2 zulässig sein, weil nur mit wäßrigen Lösungen von Kreatin und Kreatinin gearbeitet wird, Störungen durch Chromogene sind also nicht zu erwarten.
Es sind jeweil die Mittelwerte aus drei Messungen angegeben.

Tab.4: Meßwerte zu Versuch 1 - 4 (S.24)

Versuch	1		2		3		4	
Konzentration (µmol/l)	Kreatin		Kreatinin		Kreatinin		Kreatinin	
	E	%	E	%	E	%	E	%
25	0,024	40,0	0,023	38,3	0,036	60,0	0,060	100
50	0,045	37,5	0,044	36,7	0,072	60,0	0,120	100
100	0,089	37,2	0,091	38,1	0,143	59,8	0,239	100
200	0,180	38,0	0,185	39,0	0,286	60,3	0,474	100
500	0,448	38,5	0,455	39,1	0,711	61,1	1,164	100

Mittelwert aus Versuch 1: $\bar{x}_1$ = 38,24% Theorie: 39%

Mittelwert aus Versuch 2: $\bar{x}_2$ = 38,24% 39%

Mittelwert aus Versuch 3: $\bar{x}_3$ = 60,24% 61%

Auswertung:
Das Ergebnis zeigt, daß gleiche molare Mengen Kreatinin bzw. Kreatin nach Einwirkung von Creatininase unter gleichen Versuchsbedingungen zu einer gleich starken Farbstoffausbildung führen. Das beweist, daß Creatininase die Gleichgewichtseinstellung von beiden Seiten her katalysiert.

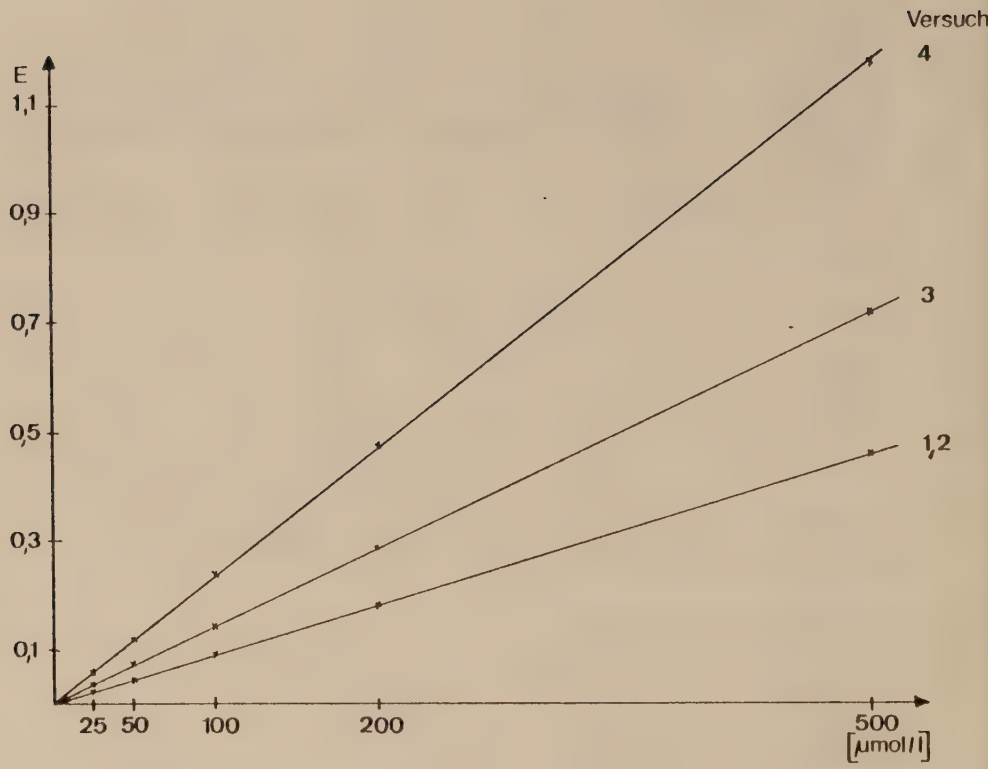


Abb.5 Zum Einfluß von Creatininase auf Kreatin und Kreatinin

Mischungsversuche von Kreatinin und Kreatin

Aus der oben beschriebenen Versuchsreihe geht hervor, daß bei Anwendung der Methode Schmid auf kreatinhaltiges Probenmaterial falsche Untersuchungsergebnisse zu erwarten sind. Es interessiert, wie groß der Fehler ist.

Versuchsanordnung: Es wurden verschiedene Mischungen molarer wäßriger Lösungen von Kreatinin und Kreatin hergestellt und nach dem Mikroansatz bestimmt. Es sollte geprüft werden, ob die Meßergebnisse den theoretischen Erwartungen entsprechen.

Bei dem Ansatz 50/umol/l Kreatinin - 100/umol/l Kreatin war

ein Austausch von Proben- und Referenzküvette erforderlich, weil die Referenzlösung eine höhere Extinktion zeigte als die Probe. Das Meßergebnis ist deswegen negativ angegeben. Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Bestimmungen angegeben.

Theoretische Erwartung: Die gemessene Extinktion entspricht der Differenz der Extinktionen, die man bei Untersuchungen reiner Kreatininlösungen (Werte s.o. Versuch 3) und reiner Kreatinlösungen (Werte s.o. Versuch 1) erhalten würde. Bei gleichbleibender Kreatininkonzentration und steigender Kreatinkonzentration ist mit einer Extinktionsabnahme zu rechnen, denn mit zunehmender Kreatinmenge muß die auf der Referenzseite unter Einfluß von Creatininase gebildete Kreatininmenge anwachsen, der Unterschied in der Farbstoffausbildung zwischen Probe und Referenz muß folglich kleiner werden. Bei entsprechenden Konzentrationsverhältnissen von Kreatinin und Kreatin sind schließlich sogar Werte gleich Null oder negative Meßergebnisse zu erwarten.

Auswertung:

Die Ergebnisse entsprechen den theoretischen Erwartungen, die Meßwerte betragen im Mittel 100,26% der Theorie.
Das bedeutet, daß die Methode Schmid auf Bestimmungen im Serum nicht anwendbar ist, sie liefert falsche Ergebnisse. Wie aus der Tabelle und den Zeichnungen hervorgeht, müssen die Kreatininwerte im Patientenserum in Abhängigkeit von der Kreatinkonzentration immer zu niedrig ausfallen. Die Untersuchungen erklären auch, warum Schmid in manchen Seren kein Kreatinin gefunden hat.
Schmid überprüfte die Richtigkeit seiner Methode mit Calibrate^{R}-Referenzseren. Dabei handelt es sich um ein Serum mit eingewogenen Bestandteilen, die auf dem Kontrollzettel angegebenen Werte sind absolute Konzentrationsangaben und nicht nach anderen gebräuchlichen Methoden ermittelt. Schmid fand eine Übereinstimmung zwischen der Kreatinin-Albumin-Eichgerade und der mit Calibrate^{R}-Seren unterschiedlicher Kreatininkonzentration erstellten Eichgerade. Daraus schloß er auf

die Richtigkeit seiner Methode. Der Grund für die Übereinstimmung wird darin zu sehen sein, daß ein Serum mit eingewogenen Bestandteilen offensichtlich kein Kreatin enthält, denn es hat klinisch keine Bedeutung, Herstellerangaben fehlen. Wie oben gezeigt, liefert die Methode in kreatinfreiem Probenmaterial aber richtige Ergebnisse.

Ein weiterer Parameter für die Überprüfung der Richtigkeit sind Zumischversuche. Schmid setzte verschiedenen Patientenseren unterschiedliche Mengen Kreatinin zu, die Wiederfindungsrate betrug im Durchschnitt 100,6%. Der Fehler dieser Methode läßt sich durch Aufstockversuche auch nicht feststellen, denn die Kreatinmenge bleibt dabei unverändert, vergl. dazu Tab.5 und Abb.6-8. Bei Erhöhung der Kreatininmenge ändert sich nur der relative Fehler (%).

Prozentualer Fehler der Methode für Bestimmungen im Normalbereich

Als Normalbereich für die Serumkonzentration bei gesunden Probanden gilt:

Kreatinin 0,47 - 1,10 mg/100ml ≙ 42 - 97 µmol/l [5]
(Frauen 0,47 - 0,90 mg/100ml)
(Männer 0,55 - 1,10 mg/100ml)

Kreatin 0,3 - 0,7 mg/100ml ≙ 20,1 - 46,9 µmol/l [31]

Wie sich aus Abb.9 entnehmen läßt, beträgt der Fehler der Methode Schmid zwischen 12 und 65%, wenn die Werte von Kreatinin und Kreatin beide im Normalbereich liegen. Bei erhöhten Kreatin- und niedrigen Kreatininwerten wird der Fehler noch größer.

Tab.5: Ergebnisse der Mischungsversuche von Kreatinin und Kreatin

Kreatinin (/umol/l)	Kreatin (/umol/l)	E	Theorie $E_{V3}-E_{V1}$	% der Theorie	ΔE zu 0/umol/l Kreatin/ a) gemessen b) Theorie a	b	Fehler in % a) gemessen b) Theorie a	b
50	0	0,072	-	-	-	-	-	-
	25	0,049	0,048	102,08	0,023	0,024	31,94	33,33
	50	0,027	0,027	100,00	0,045	0,045	62,5	62,5
	100	-0,0163	-0,017	104,10	0,088	0,089	122,22	123,61
100	0	0,143	-	-	-	-	-	-
	25	0,119	0,119	100,00	0,024	0,024	16,78	16,78
	50	0,099	0,098	101,02	0,044	0,045	30,77	31,47
	100	0,054	0,054	100,00	0,089	0,089	62,24	62,24
200	0	0,286	-	-	-	-	-	-
	25	0,259	0,262	98,86	0,027	0,024	9,44	8,39
	50	0,238	0,241	98,76	0,048	0,045	16,78	15,73
	100	0,195	0,197	98,99	0,091	0,089	31,82	31,12
500	0	0,711	-	-	-	-	-	-
	25	0,686	0,687	99,85	0,025	0,024	3,52	3,38
	50	0,667	0,666	100,15	0,044	0,045	6,19	6,33
	100	0,617	0,622	99,20	0,094	0,089	13,22	12,52

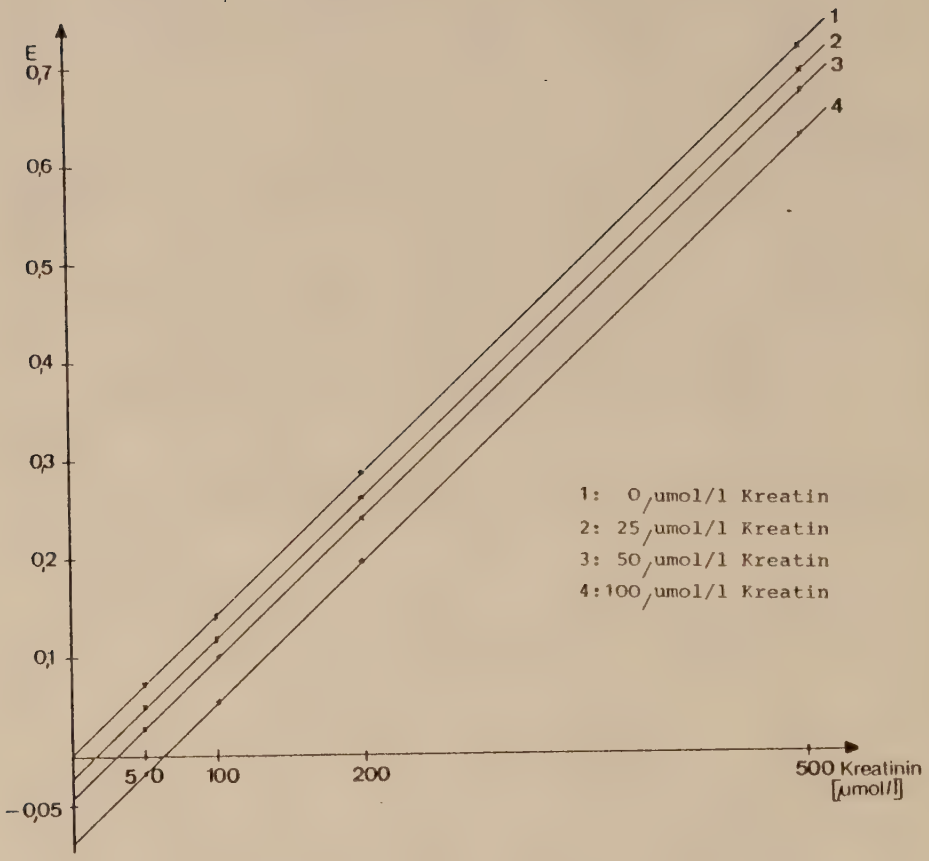


Abb.6 Verschiebung der Eichgerade durch den Einfluß von Kreatin: Die Steigung der Geraden bleibt unverändert, während mit steigender Kreatinmenge eine Parallelverschiebung nach unten stattfindet, d.h. es ergeben sich geänderte Schnittpunkte mit der x- und der y-Achse. Aus diesem Diagramm folgt, daß sich die Richtigkeit der Methode Schmid nicht durch Zumischversuche beweisen läßt, (vgl. S. 28).

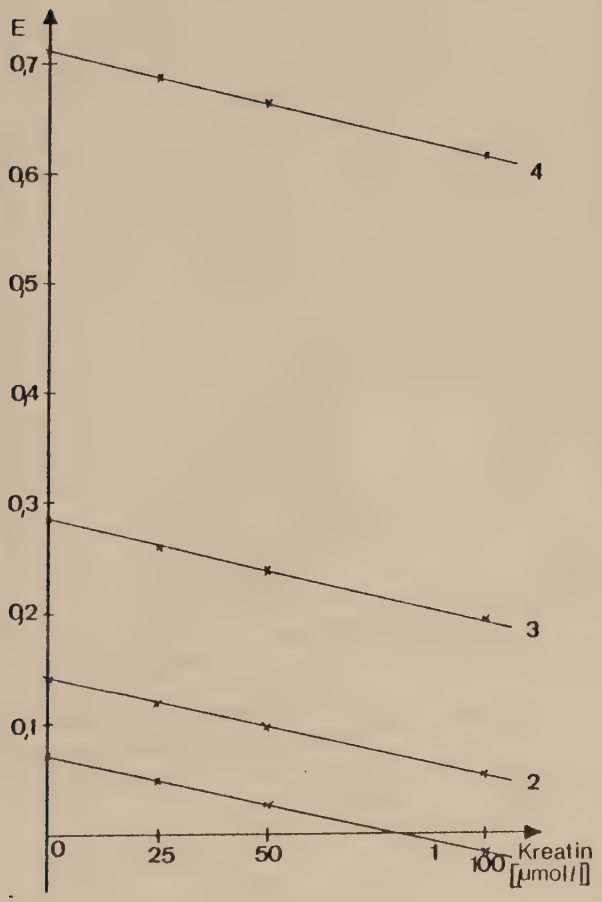


Abb.7 Änderung der Extinktion in Abhängigkeit von der Kreatinkonzentration

1: 50 µmol/l Kreatinin
2: 100 µmol/l Kreatinin
3: 200 µmol/l Kreatinin
4: 500 µmol/l Kreatinin

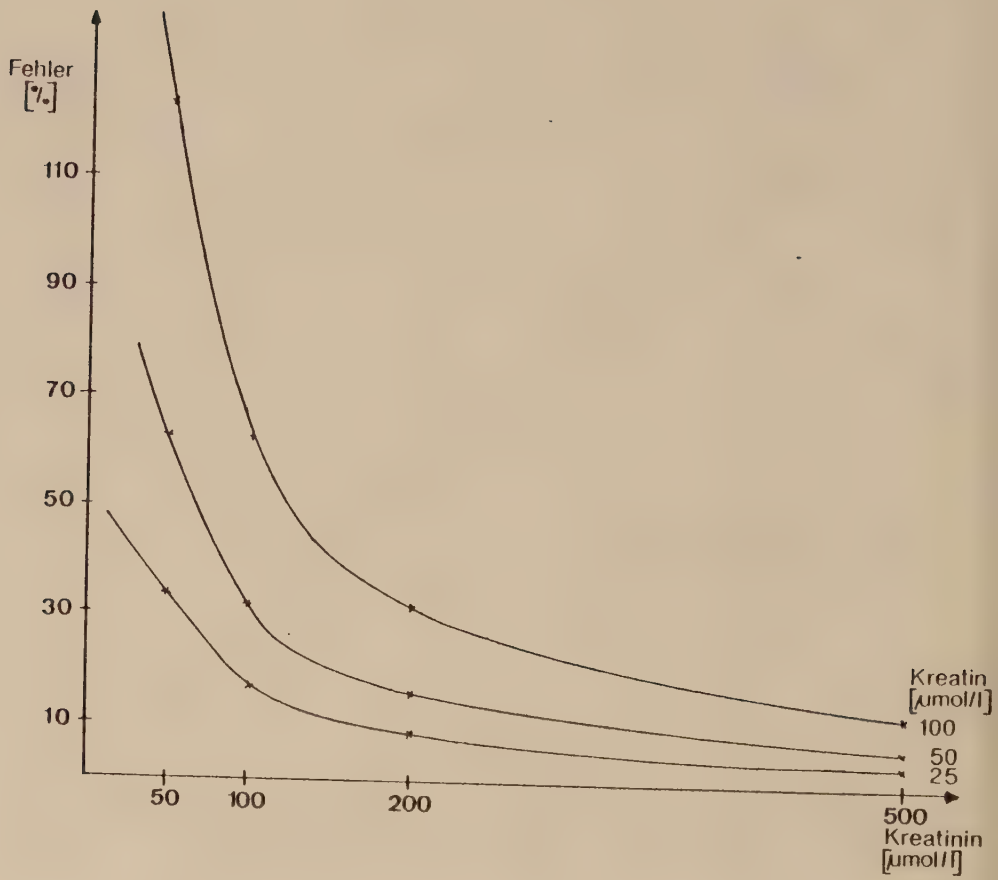


Abb.8 Fehler durch Kreatin

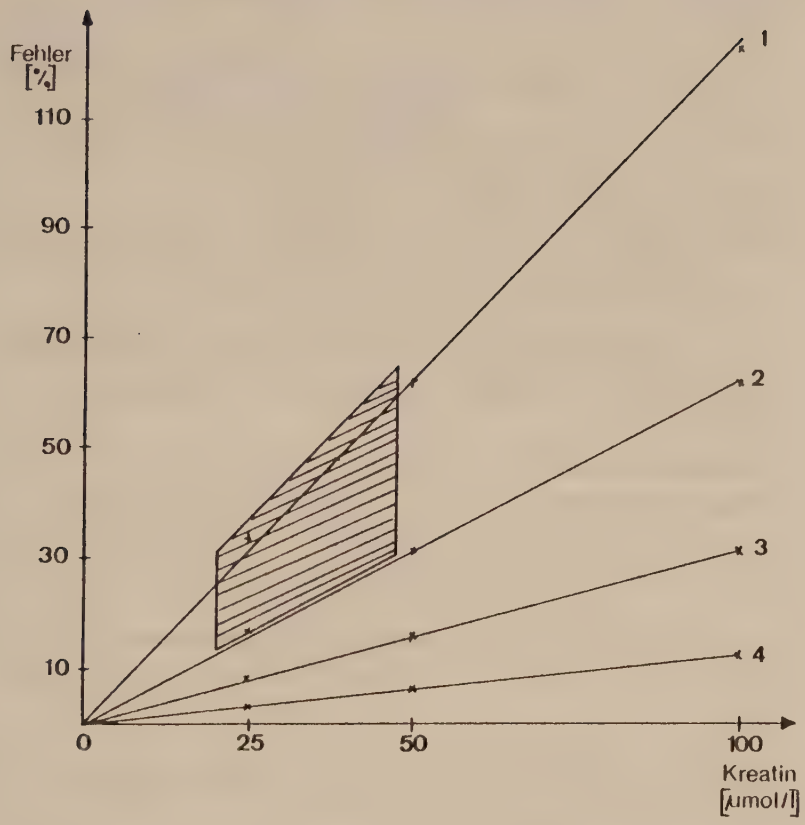


Abb.9 Fehlergrenzen für Bestimmungen in kreatinhaltigem Probenmaterial nach Methode Schmid
schraffiert: Fehlerbereich für Kreatin- und Kreatininkonzentrationen im Normalbereich

1: 50 µmol/l Kreatinin
2: 100 µmol/l Kreatinin
3: 200 µmol/l Kreatinin
4: 500 µmol/l Kreatinin

2.4. Erstellen einer Arbeitsvorschrift

Die Methode nach M.Schmid soll in folgenden Punkten verbessert werden:

- Störungen durch Kreatin müssen ausgeschlossen werden.
- Der hohe Serumbedarf soll gesenkt werden (2x500 µl - 1000 µl Serum, das entspricht mehr als 2 ml Vollblut.)
- Ein vollständiger Abbau des Kreatinins, bisher beträgt er 61%, ist anzustreben.
- Die Eichgerade sollte bis zu höheren Serumkonzentrationen als 8 mg/100ml (≙ 707 µmol/l) Kreatinin linear sein.

Es soll eine Mikromethode entwickelt werden, die folgenden Anforderungen entspricht:

- hohe Spezifität
- geringer Serumeinsatz (100 µl)
- Praktikabilität
- Linearität der Eichgerade bis etwa 15 mg/100ml (≙ 1326 µmol/l) Kreatinin

Damit eine Methode praktikabel, d.h. routinemäßig durchführbar ist, müssen u.a. folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

- geringer Zeitaufwand pro Messung
- Verwendung handelsüblicher Lösungen (Natronlauge)
- keine Enteiweißung der Seren
- Erreichen eines Probenendvolumens, das den Einsatz von Halbmikro-Einmalküvetten zuläßt, um das zeitraubende Reinigen und Trocknen von Mikroküvetten einzusparen.

Als spezifisch gelten enzymatische Methoden zur Bestimmung von Kreatinin, Nachteile vgl. S.11. Beim ausschließlichen Einsatz von Creatininase kommt es allerdings nur zu einer Gleichgewichtseinstellung. Um einen vollständigen Abbau des Kreatinins zu erreichen und gleichzeitig die Störung durch Kreatin auszuschalten, ist es erforderlich, das bereits vorhandene und das aus Kreatinin gebildete Kreatin aus dem Gleichgewicht zu entfernen. Dazu ist eine Methode

zu wählen, die spezifisch für Kreatin ist und die die Creatininase nicht zerstört. Als Enzym ist sie empfindlich gegen aggressive Chemikalien, insbesondere gegen größere Verschiebungen des pH-Wertes (Verschiebung aus dem optimalen Wirkungsbereich bis zur Denaturierung), und auf Temperaturerhöhung (Denaturierung).
Hier bietet sich als schonendes Verfahren der Einsatz weiterer Enzyme an, denn wenn Kreatin ständig weiter umgesetzt wird, so kann sich kein Gleichgewicht einstellen, es kommt zu einem vollständigen Abbau des Kreatinins.
Ein vollständiger Abbau des Kreatinins hätte noch einen weiteren Vorteil: die Extinktionsdifferenz zwischen Probe und Referenz würde, im Vergleich zur Methode Schmid, um ca. 64% zunehmen, entsprechend 61 bzw. 100% abgebautem Kreatinin.
Das bedeutet eine stärkere Steigung der Eichgerade bei gleichbleibender Probenmenge oder die Möglichkeit zur Verringerung des Probenvolumens bei etwa gleichbleibender Extinktion im Vergleich zur alten Methode.
Wenn sich eine geeignete Enzymkombination finden läßt, wären die Voraussetzungen für einen spezifischen Test im Mikromaßstab gegeben.

Testansatz mit einer selbst hergestellten Enzymmischung

(vergl. hierzu S. 12, Schema des enzymatischen Abbaus von Kreatinin).
Das von Wahlefeld vorgeschlagene vollenzymatische Verfahren[27,28,29] beruht auf einer Messung der Extinktionsabnahme bedingt durch die Überführung von NADH in NAD^+ im letzten Schritt mehrerer hintereinandergeschalteter enzymatischer Reaktionen, d.h. der Abbau muß vollständig bis zur Endstufe ablaufen, damit eine quantitative Auswertung möglich ist. Für eine Verbesserung der Methode Schmid ist das aber nicht erforderlich, hier kommt es nur auf eine Ausschaltung der Störung durch Kreatin an, die quantitative Auswertung soll über eine modifizierte Jaffé-Reaktion er-

folgen. Der hier beschriebene Test basiert auf der Überlegung, daß für einen vollständigen Abbau des Kreatinins folgende Schritte genügen müßten:

$$\text{Kreatin} + \text{ATP} \xrightarrow{CK} \text{Kreatin-P} + \text{ADP}$$

$$\text{ADP} + \text{PEP} \xrightarrow{PK} \text{ATP} + \text{Pyruvat}$$

Das spart den Zusatz von NADH und LDH ein.

Alle verwendeten Enzyme, PEP und ATP wurden von Boehringer bezogen. Die Wahl der Konzentrationen bzw. Aktivitäten im Enzymgemisch erfolgte in Anlehnung an die Boehringer-Test-Kombination Creatinin enzymatisch, Best.Nr. 166 413.

Lösung I: 40 mg ATP = Adenosintriphosphat
4,6 mg PEP = Phosphoenolpyruvat
lösen in 1,00 ml H_2O

Lösung II: 20 mg CK = Creatin-Kinase
20,3 mg $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$
0,5 ml PK = Pyruvat-Kinase
0,5 ml H_2O

Enzym-Substrat-Mischung:
100 µl Lösung I
100 µl Lösung II
800 µl Detergenz-Puffer-Lösung Boehringer
1000 µl
(bei Verwendung von Wasser anstelle der Pufferlösung flockt die Lösung aus).

Die Versuche wurden durchgeführt mit wäßrigen Lösungen von Kreatinin und Kreatin.
Stammlösungen: Kreatinin 100,0 mg/100,00ml (≙ 8840 µmol/l)
Kreatin 50,0 mg/100,00ml (≙ 3352 µmol/l)

Zur Kontrolle, ob Kreatinin vollständig erfaßt wird, wurden die Versuche parallel mit der Boehringer-Enzym-Substratmischung durchgeführt, d.h. in Gegenwart von NADH und LDH.

Enzym-Substrat-Mischung:

100 µl Substrat-Lösung Boehringer SB 2
100 µl Enzym-Lösung Boehringer EB 3
800 µl Detergenz-Puffer-Lösung Boehringer
1000 µl

(die Konzentrationen im Endansatz entsprechen denen des Boehringer-Tests).

SB 2 = Substratlösung Boehringer 2: NADH, ATP, PEP
EB 3 = Enzymlösung Boehringer 3 : CK, PK, LDH, $MgCl_2$

Arbeitsvorschrift

	Probe (µl)	Referenz (µl)
wäßr.Kreatininlsg. bzw. Serum	50	50
Enzym-Substrat-Mischung	50	50
Creatininase	-	5
Glycerin 3,5%	5	-
Inkubationszeit 30 Minuten bei 30°C		
Pikrinsäurelsg. 14 mmol/l	100	100
Natronlauge 1 N	200	200
Inkubationszeit 5 Minuten bei 30°C		
Natriumdihydrogen-phosphatlsg. 9%	200	200
nach 2 Minuten Messung bei 484 nm/30°C		

Auswertung der Messung

Versuch 1 (V1) = eigene Enzym-Substrat-Mischung
Versuch 2 (V2) = Enzym-Substrat-Mischung nach Boehringer

Tab.6: Meßwerte bei Verwendung unterschiedlicher Enzym-Substrat-Mischungen

Kreatinin (mg/100ml)	Kreatin (mg/100ml)	E(V1)	E(V2)
1	-	0,074	0,101
1	0,5	0,062	0,102
1	1	0,054	0,101
2	-	0,137	0,201

Das Ergebnis dieser Meßreihe ist nicht zufriedenstellend. Die Meßwerte zeigen, daß

1. Kreatinin nicht vollständig umgesetzt wird und
2. Kreatin in Abhängigkeit von der Konzentration stört.

Ferner erfordert das Einwiegen der Enzyme sehr viel Zeit.

Günstigere Ergebnisse ließen sich bei diesem Ansatz vielleicht durch Verlängerung der Inkubationszeit erzielen. Das scheidet aber aus praktischen Überlegungen aus, der Zeitaufwand pro Analyse würde zu groß. Dieser Ansatz eignet sich also nicht zur Kreatininbestimmung.

Versuche mit der Enzym-Substrat-Mischung nach Boehringer

Vorversuche: Arbeitsvorschrift

	Probe (ml)	Referenz (ml)
wäßr.Kreatininlsg. bzw. Serum	0,5	0,5
SB 2	0,02	0,02
EB 3	0,02	0,02
Creatininase	-	0,02
Glycerinlsg. 3,5%	0,02	-
Inkubationszeit 30 Minuten bei 30°C		
Natronlauge 1 N	1,0	1,0
Pikrinsäurelsg. 14 mmol/l	0,5	0,5
Inkubationszeit 5 Minuten bei 30°C		
Natriumdihydrogen-phosphatlsg. 9%	1,0	1,0
nach 2 Minuten Messung bei 484 nm bei 30°		

Ergebnisse der Vorversuche:

1. Kreatinin wird quantitativ erfaßt (Versuch 1 - Versuch 2)
2. Kreatin scheint nicht zu stören (Versuch 6)
3. Die Extinktionszunahme scheint der Kreatininkonzentration direkt proportional zu sein (Versuch 1,3,4,5).

Tab.7: Ergebnisse der Vorversuche mit einer Enzym-Substrat-Mischung

	Kreat.lsg. 1mg/100ml	H_2O	SB 2	EB 3	H_2O	Gly	C-ase	E
1. Probe	0,5	-	-	-	0,06	-	-	0,20
Referenz	-	0,5	-	-	0,06	-	-	
2. Probe	0,5	-	0,02	0,02	-	0,02	-	0,20
Referenz	0,5	-	0,02	0,02	-	-	0,02	
3. Probe	-	0,5	0,02	0,02	-	0,02	-	0,00
Referenz	-	0,5	0,02	0,02	-	-	0,02	
4. wie 2., aber 2 mg/100ml Kreatinin								0,39
5. wie 2., aber 3 mg/100ml Kreatinin								0,60
6. wie 2., aber zusätzlich 1 mg/100ml Kreatin								0,19

Alle Angaben in ml, Durchführung der Versuche nach Vorschrift S. 39.

Auswertung

Eine Korrektur und Verbesserung der Methode Schmid scheint durch nachgeschaltete enzymatische Folgereaktionen möglich zu sein, die Umsetzung muß aber bis zur Stufe Lactat + NAD^+ erfolgen.

Durch den quantitativen Abbau des Kreatinins steigen die gemessenen Extinktionen wie erwartet um ca. 60% an, d.h. man erhält eine sehr steile Eichgerade. Das bedeutet, daß der Meßbereich mit linearer Extinktionszunahme schon bei verhältnismäßig niedrigen Kreatininkonzentrationen überschritten wird. Die eingesetzten Proben müßten dann verdünnt werden, das würde aber eine weitere Fehlerquelle bedeuten. Im Hinblick auf die angestrebte Mikromethode erscheint es dagegen sinnvoll zu sein, von vornherein die eingesetzte Probenmenge zu verringern bei gleichbleibenden Volumina

der anderen Reagenzien.
Nachteile des Verfahrens sind noch die sehr lange Inkubationszeit von 30 Minuten sowie der zusätzliche Pipettierschritt bei Zugabe der Enzyme und Substrate.

Daraus ergibt sich als Ziel für weitere Versuche:
Übertragung auf Mikroansatz mit verringertem Probenvolumen
Verkürzung der Reaktionszeit
Einsparung eines Pipettierschrittes.

Untersuchung zur Zeitabhängigkeit des enzymatischen Abbaus

Die Reaktionszeit von 30 Minuten erscheint sehr lange, die Gesamtzeit von 37 Minuten pro Analyse (ohne Probenvorbereitung) bietet gegenüber anderen Methoden keine Vorteile. Zu prüfen ist, ob Kreatinin bereits zu einem früheren Zeitpunkt quantitativ erfaßt werden kann und Störungen durch Kreatin ausgeschaltet sind.
Die Versuche wurden nach der Arbeitsvorschrift S.42 durchgeführt, verändert wurde jeweils nur die erste Inkubationszeit.

Tab.8: Abhängigkeit der gemessenen Extinktion E von der Inkubationszeit

Kreatinin (mg/100ml)	gemessene Extinktion E nach 10	15	20	30 Minuten	E
1	0,099	0,096	0,101	0,099	0,0988
5	0,496	0,490	0,509	0,491	0,4965
8	0,782	0,812	0,785	0,779	0,7895

Auswertung

Die Meßwerte nach 10, 15, 20 und 30 Minuten stimmen weitgehend überein, eine Extinktionszunahme in Abhängigkeit von der Inkubationszeit wird nicht beobachtet. Die größte Abweichung von der mittleren Extinktion beträgt nach

10 Minuten weniger als 1%. Das Ergebnis zeigt, daß eine Reaktionszeit von 10 Minuten ausreicht, das bedeutet eine Verkürzung der Analysendauer um über 50% von 37 Minuten auf 17 Minuten (jeweils ohne Probenvorbereitung). Gegenüber der enzymatischen Methode Boehringer beträgt die Zeitersparnis 13 Minuten. Das läßt sich damit begründen, daß bei der vollenzymatischen Methode die Reaktion quantitativ bis zur Endstufe ablaufen muß, beim kombinierten Verfahren mit nachgeschalteter Farbreaktion genügt es dagegen, das vorhandene und neu gebildete Kreatin schnell genug dem Gleichgewicht zu entziehen.

Neue Arbeitsvorschrift für einen kombinierten Enzym-Jaffé-Farbtest

	Probe (/ul)	Referenz (/ul)
wäßr.Kreatininlsg. bzw. Serum	50	50
Enzym-Substrat-Mischung	50	50
Creatininase	-	5
Glycerinlsg. 3,5%	5	-
Inkubationszeit 10 Minuten bei 30°C		
Natronlauge 1N	200	200
Pikrinsäurelsg. 14 mmol/l	100	100
Inkubationszeit 5 Minuten bei 30°C		
Natriumdihydrogen-phosphatlsg. 9%	200	200
nach 2 Minuten Messung bei 484 nm/30°C		

Zusammensetzung der Enzym-Substrat-Mischung:

100 /ul SB 2
100 /ul EB 3
800 /ul H_2O
1000 /ul

Bei Raumtemperatur ist die Mischung ca. 3 Stunden haltbar.

2.5. Prüfung der Methode

Linearität

Eichgerade für den neuen Mikroansatz, durchgeführt mit wäßrigen Kreatininlösungen

Arbeitsvorschrift siehe S.42
Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Bestimmungen angegeben.

Tab. 9: Meßwerte der Eichgerade für wäßrige Kreatininlösungen

Kreatinin (mg/100ml)	Extinktion bei 484 nm
0,5	0,051
1	0,102
2	0,201
3	0,303
5	0,504
8	0,804
10	0,997

Gleichung der Eichgerade: $y = 0{,}100x + 0{,}002$

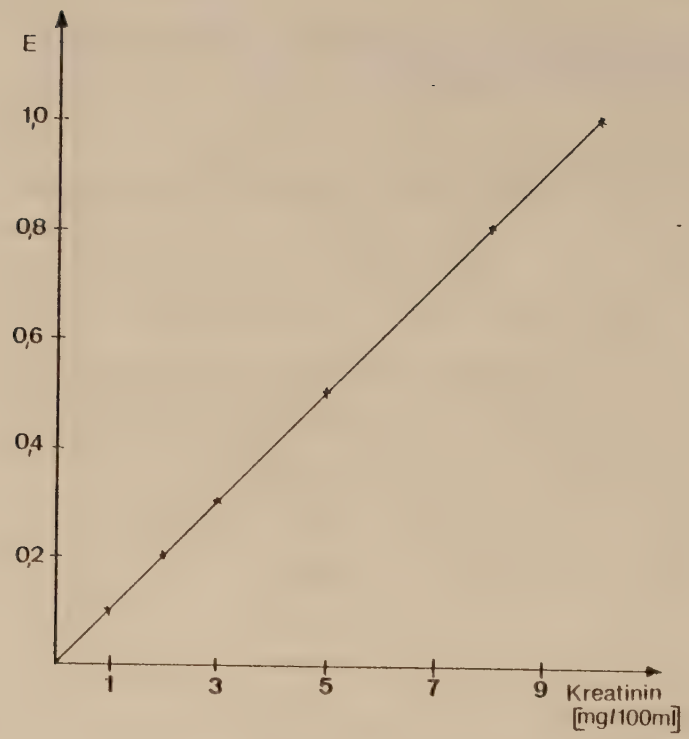


Abb.10 Eichgerade für wäßrige Kreatininlösungen

Eichgerade für den neuen Mikroansatz, durchgeführt mit künstlichem Serum

Arbeitsvorschrift s.S.42 , Herstellung künstliches Serum S. 21.
Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Bestimmungen angegeben.

Tab.10 Meßwerte für Kreatinin-Albumin-Lösungen

Kreatinin (mg/100ml)	Extinktion bei 484 nm
0	0,001
0,25	0,025
0,5	0,050
1	0,100
2	0,195
3	0,291
4	0,393
6	0,590
8	0,789
10	0,983
12	1,178
14	1,365
16	1,555

Gleichung der Eichgerade: $y = 0{,}0975x + 0{,}001$

Die Eichgerade verläuft linear bis zu einer Kreatininkonzentration von 16 mg/100ml (≙ 1415 µmol/l).

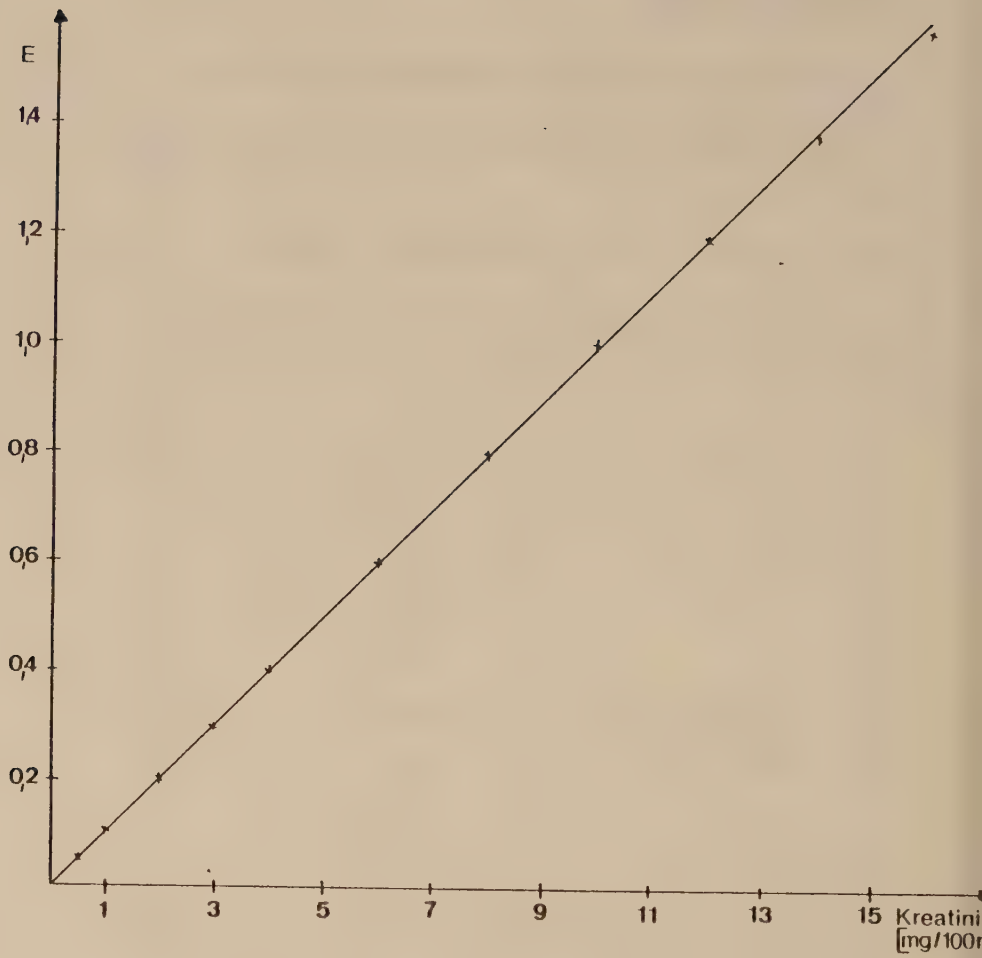


Abb.11 Eichgerade für künstliches Serum, aufgenommen nach der neuen Mikromethode.

Beeinflussung der Bestimmungen durch Kreatin

Es soll überprüft werden, ob die vorliegende Methode durch die Anwesenheit größerer Kreatinmengen gestört wird, insbesondere wegen der auf 10 Minuten verkürzten Inkubationszeit.

Die Untersuchungen wurden mit wäßrigen Kreatinin- und Kreatinlösungen durchgeführt nach der Arbeitsvorschrift S. 42. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen.

Tab.11 Messungen in Gegenwart von Kreatin

Kreatinin (mg/100ml)	Kreatin (mg/100ml)	E
1	0	0,102
	0,75	0,101
	1,5	0,104
5	0	0,504
	0,75	0,504
	1,5	0,497
8	0	0,804
	0,75	0,803
	1,5	0,798

Auswertung:

Kreatin stört die Bestimmung nicht, das gilt auch bei sehr hohen Konzentrationen von Kreatinin und Kreatin.

Normalbereiche von Kreatinin und Kreatin vergl. S. 28. (0,75 mg/100ml ≙ 50,3 µmol/l entsprechen in etwa der oberen Grenze des Normalbereiches, 1,5 mg/100ml ≙ 100,6 µmol/l der doppelten Höchstmenge Kreatin im Serum).

Test von Störsubstanzen bei Bestimmungen in künstlichem Serum

1) Zusatz von Kreatin
2) Zusatz von Chromogenen

1) Zusatz von Kreatin zu künstlichem Serum

Arbeitsvorschrift siehe S.42
Künstliches Serum siehe S.21

Tab.12 Beeinflussung der Kreatininbestimmung im künstlichen Serum durch Kreatin

Kreatinin (mg/100ml)	Kreatin (mg/100ml)	E	Kreatinin gefunden (mg/100ml)
1	0	0,098	1,00
	0,5	0,099	1,01
	1,0	0,098	1,00
2	0	0,194	1,98
	0,5	0,193	1,97
	1,0	0,195	1,99

Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Messungen angegeben.

Auswertung:
Wie bereits die Versuche mit wäßrigen Lösungen gezeigt haben, stört Kreatin die Bestimmung des Kreatinins nicht.

2) Zusatz von Chromogenen zu künstlichem Serum

Bei der klassischen Jaffé-Reaktion erfaßt man neben Kreatinin auch andere Chromogene, darunter versteht man Stoffe, die ebenfalls mit alkalischer Pikratlösung reagieren. Das gemessene "Gesamtkreatinin" liegt folglich höher als der tatsächliche Kreatiningehalt des Serums, das fällt besonders bei niedrigen Kreatininkonzentrationen ins Gewicht[2].
Die wichtigsten Nichtkreatininchromogene im Plasma sind: Acetessigsäure, Aceton, Pyruvat, Glucose, Ascorbinsäure[2], Hydantoin, Bilirubin, Harnsäure usw.[3].

Durchführung der Versuche:
Arbeitsvorschrift siehe S. 42
künstliches Serum siehe S. 21
Es wurden künstliche Seren aus Albumin, wäßriger Kreatininlösung und wäßrigen Lösungen der Chromogene hergestellt, Bilirubin wurde unter Zusatz von Natriumhydrogencarbonat in Lösung gebracht.

Tab.13: Einfluß von Chromogenen auf die Kreatininbestimmung

Chromogen (mg/100ml)	Normalwert im Serum[4] (mg/100ml)	zugesetzte Menge (mg/100ml)	zugesetzte Menge (µmol/l)	E	Kreatinin gefunden (mg/100ml)
---	---	---	---	0,098	1,00
Glucose	61-130	150	8325	0,098	1,00
		300	16650	0,095	0,97
		1000	55500	0,100	1,02
Hydantoin		1	100	0,100	1,02
		5	500	0,097	0,99
Aceton	0,23-0,35	1	172	0,098	1,00
		5	860	0,096	0,98
Ascorbinsäure	0,2-1,4	1	57	0,098	1,00
		5	285	0,098	1,00
Bilirubin	0,26-1,4 (gesamt)	1	17	0,097	0,99
		5	85	0,099	1,01
		20	342	0,099	1,01
Na-Pyruvat	0,3-1,0	1	91	0,098	1,00
		5	455	0,098	1,00

Die Kreatininkonzentration betrug jeweils 1 mg/100ml Serum (≙ 88,4 µmol/l). Es sind die Mittelwerte aus drei Bestimmungen angegeben.

Auswertung:
Die zugesetzten Chromogene stören in den angegebenen Konzentrationen die Bestimmung des Kreatinins nicht. Bei den Ver-

suchen wurden die Normalwerte der Störsubstanzen im Serum um ein Mehrfaches überschritten. Wegen der Versuchsanordnung, Arbeit mit Probe und Referenz, war ein anderes Ergebnis auch nicht zu erwarten.

Richtigkeit und Präzision

Zur Sicherung der Qualität der Ergebnisse quantitativer Bestimmungsmethoden muß im klinisch-chemischen Laboratorium entsprechend den Richtlinien der Bundesärztekammer[32] eine kontinuierliche Kontrolle der Präzision (Reproduzierbarkeit) und Richtigkeit durchgeführt werden.

Bestimmung der Richtigkeit

Die Richtigkeit einer Methode gibt an, um wieviel ein einzelner Meßwert von der tatsächlich im Untersuchungsmaterial vorliegenden Menge abweicht. Sie ist die Kenngröße für den systematischen Fehler.
Für die Beurteilung der Richtigkeit gibt es drei Methoden[2]:

a) Zusatzversuche
b) Mischversuche
c) Vergleichsversuche

a) Zusatzversuche

Dem Untersuchungsmaterial werden bekannte Mengen der Analysensubstanz zugesetzt.

Durchführung der Versuche:
1200 µl Serum von bekanntem Gehalt werden 50 µl wäßrige Kreatininlösung zugesetzt. Das Gesamtvolumen steigt dadurch auf 1250 µl, der ursprüngliche Gehalt des Serums sinkt um 4% auf 96%. Die Bestimmung der Wiederfindungsrate wird nach der Arbeitsvorschrift S. 42 durchgeführt. Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Bestimmungen angegeben. (Tab.14)

Serum I : ursprünglicher Gehalt: 0,75 mg (E = 0,074)
96% ≙ 0,72 mg (E = 0,071)
durchschnittliche Wiederfindungsrate: 100,175%

Serum II : ursprünglicher Gehalt: 2,03 mg (E = 0,199)
96% ≙ 1,95 mg (E = 0,191)
durchschnittliche Wiederfindungsrate: 99,9%

b) Mischversuche

Seren verschiedener Kreatininkonzentrationen werden miteinander gemischt.

Durchführung der Versuche:
Die Seren werden in gleichen Volumenverhältnissen gemischt, der Gehalt der Seren und ihrer Mischungen wird nach der Arbeitsvorschrift S. 42 bestimmt. Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Messungen angegeben (Tab.15).

c) Vergleichsversuche

Mindestens 50 Seren werden a) mit der zu prüfenden Methode, b) mit einer anderen, möglichst zuverlässigen Methode analysiert. Nach Möglichkeit sollte die Referenzmethode gewählt werden, darunter versteht man eine Methode, in der der Nachweis der absoluten Richtigkeit erbracht wurde, und an der die Qualität anderer Methoden gemessen wird[33]. Als Maß für die Übereinstimmung zweier Methoden wird der Korrelationskoeffizient angegeben. (siehe S. 53: 3. Statistischer Methodenvergleich).

Tab.14: Ergebnisse der Zusatzversuche

	zugesetztes Kreatinin (mg/100ml)	Gesamt-Kreatinin (mg/100ml)	E	gefundenes Kreatinin (mg/100ml) (µmol/l)		Theorie Kreatinin (mg/100ml) (µmol/l)		% der Theorie
Serum I	0	0,72	0,071	0,72	64	0,72	64	
	1	1,72	0,170	1,73	153	1,72	152	100,6
	2	2,72	0,268	2,73	242	2,72	240	100,4
	4	4,72	0,455	4,64	410	4,72	417	98,3
	8	8,72	0,866	8,84	781	8,72	771	101,4
Serum II	0	1,95	0,191	1,95	172	1,95	172	
	1	2,95	0,283	2,89	255	2,95	261	98,0
	2	3,95	0,392	4,00	354	3,95	349	101,3
	4	5,95	0,581	5,93	524	5,95	526	99,7
	8	9,95	0,981	10,01	885	9,95	880	100,6

Tab.15: Ergebnisse der Mischversuche

Serum	E	Kreatinin (mg/100ml)	Kreatinin (µmol/l)	Theorie (mg/100ml)	% der Theorie
1	0,199	2,03	179,5	--	--
2	0,392	4,00	353,6	--	--
3	0,280	2,86	252,6	--	--
4	0,069	0,70	62,2	--	--
5	0,356	3,63	321,1	--	--
1+2	0,294	3,00	265,2	3,015	99,5
1+3	0,241	2,46	217,4	2,445	100,6
4+5	0,213	2,17	192,1	2,165	100,2

Bestimmung der Präzision

Die Präzision ist das wichtigste Kriterium für die Zuverlässigkeit einer Methode. Sie ist die Kenngröße der zufälligen Fehler[2)]. Diese sind dafür verantwortlich, daß bei wiederholter Bestimmung derselben Analyse trotz gleichbleibender Konzentration keine übereinstimmenden Ergebnisse erzielt werden.

Nach den Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätskontrolle[32)] ist eine ausreichende Präzision dann gegeben, wenn die relative Standardabweichung (Variationskoeffizient) 5% nicht überschreitet.

Berechnung von Standardabweichung und relativer Standardabweichung:

$$S = \pm\sqrt{\frac{\Sigma(\bar{x} - x)^2}{n - 1}}$$

$$S_{rel} = VK = \frac{S \cdot 100}{\bar{x}} \%$$

S = Standardabweichung
x = Einzelwert
$\bar{x}$ = Mittelwert
n = Anzahl der Einzelwerte
S_{rel} = relative Standardabweichung
VK = Variationskoeffizient

In der Praxis sind folgende Präzisionskontrollen üblich:

- Bestimmung der Präzision in der Serie
- Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag

Präzision in der Serie

n Bestimmungen eines Serums wurden an einem Tag hintereinander durchgeführt.

a) Serum mit niedriger Kreatininkonzentration
Zahl der Bestimmungen: n = 10
Mittelwert: 0,93 mg Kreatinin/100ml (≙ 82,2 µmol/l)
Standardabweichung: S = +/- 0,0305 mg Kreatinin (≙+/- 2,7 µmol)
relative Standardabweichung: S_{rel} = VK = 3,36%

b) Serum mit mittlerer Kreatininkonzentration
Zahl der Bestimmungen: n = 20
Mittelwert: 2,05 mg Kreatinin/100ml (≙ 181,2 µmol/l)
Standardabweichung: S = +/- 0,0456 mg Kreatinin (≙ +/- 4,03 µmol)
relative Standardabweichung: S_{rel} = VK = 2,27%

c) Serum mit hoher Kreatininkonzentration
Zahl der Bestimmungen: n = 13
Mittelwert: 4,85 mg Kreatinin/100ml (≙ 428,7 µmol/l)
Standardabweichung: S = +/- 0,1002 mg Kreatinin (≙ +/- 8,86 µmol)
relative Standardabweichung: S_{rel} = 2,11%.

Tab.16: Bestimmung der Präzision in der Serie

Kreatinin (mg/100ml)	Kreatinin (µmol/l)	n	S (mg)	S_{rel} = VK
0,93	82,2	10	0,0305	3,36%
2,05	181,2	20	0,0456	2,27%
4,85	428,7	13	0,1002	2,11%

Präzision von Tag zu Tag

Zur Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag wurde ein Serum in Portionen zu 200 µl eingefroren und bei - 20°C gelagert. Täglich wurde eine Probe aufgetaut und der Untersuchung unterzogen.

Zahl der Bestimmungen: n = 20
Mittelwert: 2,05 mg Kreatinin/100ml (≙ 428,7 µmol/l)
Standardabweichung: S = +/- 0,0654 mg Kreatinin (≙ +/- 5,78 µmol)
relative Standardabweichung: S_{rel} = VK = 3,19%
= Variationskoeffizient

Auswertung:
Die Präzision der Methode entspricht in beiden Punkten den Anforderungen der Bundesärztekammer.

Vergleich des neuen Tests mit anderen enzymatischen Verfahren

Vergleich der spezifischen Extinktionen von altem und neuem Test

Die spezifische Extinktion $E^{1\%}_{1cm}$ einer gelösten Substanz ist die Extinktion einer 1%igen Lösung, bei einer Schichtdicke von 1 cm und bei einer bestimmten Wellenlänge gemessen.
Es gilt:

$$E^{1\%}_{1cm} = \frac{E}{c \cdot d}$$

Die Konzentration c (%) bezieht sich hier auf die Endkonzentration an Kreatinin im Testansatz.

Tab.17: Spezifische Extinktion bei altem und neuem Test

	$E^{1\%}_{1cm}$
Schmid Makro	740,5
Schmid Mikro	786,5
Mikro verbessert	1234

Die Verbesserung der Methode Schmid ist mit einer Zunahme der spezifischen Extinktion um ca. 60% verbunden. Das erlaubt die Verminderung der eingesetzten Serummenge um 50% bei annähernd gleichbleibender Steigung der Eichgerade, d.h. die Erhöhung der spezifischen Extinktion ist eine wesentliche Voraussetzung für die Übertragung der Methode Schmid auf eine Mikromethode.

Tab.18: Vergleich des neuen Tests mit der Methode Wahlefeld und davon abgeleiteten Verfahren

	neuer Test	Wahlefeld[27)]	Moss[20)]	Szasz[5)]
Probenvolumen(µl)	100	500	250	200
Inkubationszeit (min)	10 + 7	entfällt	6	nicht angegeben
Meßzeit (min)	entfällt	30	3	nicht angegeben
Meßwellenlänge (nm)	484	334, 340 oder 365	340	340
Steigung Eichgerade	0,0975	334:0,083 340:0,085 365:0,046	0,00475	nicht angegeben
Präzision				
-Serie (VK)	0,93:3,36% 2,05:2,27% 4,85:2,11%	0,8:4,6% 7,0:1,0%	0,99:7,1%	0,79:5,2%
-Tag zu Tag (VK) (Kreatinin mg/100ml)	2,05:3,19%	1,8:3,3%	0,76:14%	0,79:8,4%

Die Präzision des neuen Tests ist mit der der Methode Wahlefeld vergleichbar, Probenvolumen und Analysendauer sind gegenüber den anderen Verfahren deutlich reduziert.

3. Statistischer Methodenvergleich

Zur Beurteilung der Richtigkeit einer Methode werden neben Zusatz- und Mischversuchen (vergl. S.50) Vergleichsversuche herangezogen. Mindestens 50 Seren werden dabei a) nach der zu prüfenden, b) nach ein oder mehreren anderen, möglichst zuverlässigen Methoden untersucht und die Ergebnisse statistisch ausgewertet.

3.1. Kurze Darstellung der Methoden

Der kombinierte Enzym-Jaffé-Farbtest (M8) wurde mit folgenden Methoden, bezeichnet als M1 - M7, verglichen:

M1 Autoanalyzer SMA 12/60[10,11]

Die mit Kochsalzlösung verdünnte Probe wird gegen Wasser dialysiert. Das Kreatinin geht dabei in den Akzeptorstrom über und wird durch eine Jaffé-Reaktion quantitativ bestimmt. Störungen durch Chromogene lassen sich nicht vollständig ausschließen, denn als überwiegend niedermolekulare Substanzen sind sie prinzipiell auch dialysierbar.

M2 Vollenzymatisches Verfahren (Creatininase-Methode)[27]

Zum Prinzip der Bestimmung vergl. S. 11, Chromogene stören nicht.
Die Analysen wurden durchgeführt mit der Testkombination Creatininase enzymatisch, Boehringer Mannheim, Best.Nr.166413.

M3 Beckman-Creatinine-Analyzer[12]

Es handelt sich um ein automatisiertes kinetisches Verfahren. Es beruht auf der Beobachtung, daß die gemessene Extinktion nur während einer sehr kurzen Zeitspanne dem tatsächlichen Kreatiningehalt proportional ist, danach setzen Reaktionen der Nichtkreatininchromogene ein. Gemessen wird die Extinktionsdifferenz zwischen dem Zeitpunkt der Probenzugabe zur alkalischen Pikratlösung und 25,6 Sekunden danach bei 520 nm. Die Spezifität des Verfahrens beruht auf der optimierten Reaktionszeit.

M4 Boehringer-Test kinetisch ohne Enteiweißung[13)]

Kinetische Methoden beruhen auf der Voraussetzung, daß die Extinktionszunahme pro Zeiteinheit proportional der Konzentration an Kreatinin ist. Der Einfluß von Nichtkreatininchromogenen wird weitgehend ausgeschlossen durch Optimierung der Reaktionsbedingungen (Pikrinsäurekonzentration, pH-Wert, Temperatur, Reaktionszeit). Da als Standard eine wäßrige Kreatininlösung verwendet wird, sind Störungen durch das Serumalbumin möglich.
Die Analysen wurden durchgeführt mit der
Testkombination Creatinin
Boehringer Mannheim, Best.Nr. 124 192

M5 Boehringer-Test kinetisch mit Enteiweißung[14,15)]

Zum Prinzip vergl. M4, die Methode gilt aber als spezifischer, denn Störungen durch Albumin sind ausgeschlossen.
Die Analysen wurden durchgeführt mit der
Testkombination Creatinin
Boehringer Mannheim, Best.Nr. 124 192
und Zusatzreagens Trichloressigsäure Best.Nr. 125 407.

M6 Fullererde-Verfahren[9,19)]

Nach Enteiweißung mit Wolframat-Schwefelsäure wird Kreatinin an Fullererde (Lloyd's Reagens) adsorbiert. Die meisten Chromogene verbleiben im Überstand, er wird verworfen. Das Kreatinin wird durch alkalische Pikratlösung vom Niederschlag desorbiert und über das Jaffé-Reaktionsprodukt quantitativ bestimmt.
Das Verfahren gilt als spezifisch. Es liegt dem DIN-Entwurf 58 973 zugrunde und kann als derzeitige Referenzmethode betrachtet werden.

M7 HPLC-Methode[34)]

Das Kreatinin wird durch Adsorption an einen Ionenaustauscher aus dem Serum isoliert und mittels Reversed-Phase-HPLC, kombiniert mit einem UV-Detektor, quantitativ bestimmt. Störungen durch Chromogene werden durch die Kombination der beiden chromatographischen Verfahren ausgeschlossen.

3.2. Durchführung der Vergleichsversuche

Material: Verwendet wurden Patientenseren, die eingefroren, bei -25°C gelagert und unmittelbar vor Durchführung der Analysen wieder aufgetaut worden sind.
Die Bestimmungen nach M1 - M7 wurden im Zentrum für Laboratoriumsmedizin der Medizinischen Hochschule Hannover, Abteilung IV (Klinische Chemie II), Zentrallabor im Krankenhaus Oststadt unter Leitung von Dr.med.E.Henkel durchgeführt. Die Messungen mit dem kombinierten Enzym-Jaffé-Farbtest erfolgten im Pharmazeutischen Institut Tübingen.

Angabe der Einzelergebnisse (Tab.19)

M1 - M7: s.o.
M8 : kombinierter Enzym-Jaffé-Farbtest
alle Angaben in µmol/l

Stichprobenumfang

106 Seren

Tab.19: Ergebnisse der Kreatininbestimmungen nach den Methoden M1 - M8

Serum	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
001	718	660,9	640	676,0	696,8	689,5	648	721,6
002	58	53,8	60	84,1	58,2	50,5	53	47,8
003	91	80,8	70	107,8	82,2	79,5	81	63,1
004	688	621,4	610	710,7	624,9	627,6	605	696,4
005	588	589,1	530	618,8	538,6	574,6	584	515,1
006	79	73,6	80	106,0	84,2	79,5	77	73,1
007	269	217,3	260	277,5	250,8	269,6	254	233,6
008	609	560,4	580	594,0	645,5	601,1	569	553,9
009	598	549,6	530	569,3	546,8	530,4	541	488,0
010	91	82,6	80	114,9	82,2	83,9	81	62,2
011	80	75,4	80	106,0	78,1	75,2	76	65,9
012	1030	1039,9	1128	1111,2	1104,3	1037,2	1135	1018,2
013	1280	1201,6	1383	1300,7	1297,9	1178,6	1387	1090,7
014	920	883,7	1014	978,6	1004,6	895,8	1044	893,0
015	1140	1120,8	1257	1205,6	1185,4	1060,8	1294	1201,3
016	890	851,4	993	940,4	935,6	860,4	981	936,6
017	1220	1174,6	1347	1275,1	1266,6	1155,1	1311	1171,4
018	1536	1395,6	1390	1344,7	1455,5	1358,3	1539	1306,5
019	1269	1282,4	1180	1184,0	1227,3	1190,2	1224	1107,7
020	1671	1605,7	1530	1521,5	1560,4	1552,4	1671	1372,7
021	1317	1282,7	1230	1173,3	1282,8	1293,6	1327	1013,7
022	1725	1589,6	1570	1542,9	1646,7	1487,7	1698	1530,4

Serum	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
023	957	889,1	950	905,4	918,9	957,3	1008	821,8
024	798	722,0	750	851,8	814,1	789,1	742	741,5
025	1311	1255,5	1180	1125,0	1233,5	1216,0	1212	1136,1
026	1119	1190,8	1040	1087,6	1060,8	1009,1	1032	984,6
027	933	813,6	870	857,2	875,8	879,7	869	856,0
028	1230	1163,9	1130	1221,5	1171,8	1112,5	1140	1053,6
029	1344	1228,5	1210	1317,9	1258,2	1177,2	1197	1026,3
030	1143	1115,4	1040	1232,2	1079,3	983,2	1037	975,6
031	1245	1131,5	1140	1275,1	1190,3	1073,7	1127	1125,2
032	720	689,7	710	779,7	770,9	745,4	708	711,7
033	858	711,3	770	806,2	838,8	802,8	777	765,8
034	1038	959,1	920	960,0	986,8	960,4	919	879,5
035	1101	1013,0	1010	1097,9	1073,1	1032,1	1015	741,5
036	1194	1072,3	1080	1130,8	1153,3	1089,5	1087	990,0
037	1065	889,1	960	1028,9	1023,8	946,1	956	912,1
038	954	849,0	850	922,9	906,6	860,1	841	794,7
039	813	722,0	790	848,6	826,4	817,1	781	815,4
040	1278	1320,1	1240	1296,5	1288,9	1247,2	1252	1145,1
041	1071	1352,5	1300	1310,1	1369,2	1318,8	1267	1184,1
042	972	872,9	880	960,0	949,4	883,6	887	860,5
043	1341	1212,4	1220	1304,7	1251,7	1262,3	1232	1192,3

Serum	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
044	1449	1438,7	1370	1416,1	1405,5	1394,9	1386	1220,4
045	897	845,9	820	901,7	891,1	864,5	812	843,5
046	972	932,2	910	965,3	944,1	938,8	904	812,7
047	1125	1093,8	980	1050,2	1060,8	997,1	982	942,9
048	882	748,9	810	906,9	912,3	806,2	803	792,0
049	1287	1244,7	1190	1257,0	1166,9	1262,3	1181	1124,3
050	1092	1039,9	1040	1175,3	1205,6	1060,8	1047	1013,7
051	573	555,0	580	596,7	599,3	583,4	578	562,9
052	1206	1120,8	1130	1193,4	1167,9	1166,9	1144	1082,6
053	1353	1293,2	1250	1319,1	1300,5	1219,9	1271	1079,8
054	891	824,4	830	916,1	890,0	861,9	822	818,2
055	1101	1029,2	1020	1078,9	1060,8	1034,3	1047	1025,4
056	1071	1002,2	1030	1030,5	1060,8	1007,7	1028	1013,7
057	1107	1056,1	1040	1050,9	1069,9	994,5	1062	987,4
058	858	770,5	800	866,6	825,3	782,3	784	725,2
059	711	689,7	660	743,6	710,7	623,2	675	633,2
060	1176	1093,8	1030	1216,0	1108,5	1034,3	1187	956,5
061	1563	1277,0	1320	1494,1	1385,9	1365,8	1293	997,3
062	669	533,4	550	711,5	596,7	556,9	547	457,3
063	1173	1061,5	1010	1157,9	1084,7	1060,8	1047	1071,7
064	645	549,6	580	691,6	602,5	556,9	563	558,4

Serum	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
065	918	759,8	860	1099,6	897,9	769,1	794	850,6
066	1014	899,9	940	1170,7	988,1	861,9	870	838,0
067	1218	1104,6	1130	1306,3	1237,1	1060,8	1079	1078,9
068	1194	1147,7	1100	1203,1	1108,5	1021,0	1087	997,3
069	1041	996,8	960	1112,2	1000,3	928,2	945	935,7
070	1068	969,9	980	1180,1	1000,5	1075,1	1023	1008,2
071	1377	1287,8	1280	1544,5	1301,9	1376,1	1309	1144,4
072	1404	1282,4	1270	1445,3	1295,8	1333,1	1279	1218,6
073	1074	959,1	990	1087,3	988,5	1003,4	957	943,8
074	735	684,3	690	788,7	723,3	817,1	688	669,3
075	1266	1174,6	1140	1292,8	1217,5	1275,8	1178	1069,0
076	1221	1136,9	1130	1279,6	1175,3	1146,8	1129	954,7
077	1200	964,5	950	1093,7	982,4	1032,1	967	876,8
078	1221	1115,4	1070	1259,7	1145,2	1118,1	1109	1013,7
079	1068	964,5	950	1193,4	1042,7	1032,1	958	1002,8
080	942	819,0	850	1060,8	892,0	946,1	829	722,5
081	783	705,8	700	904,8	738,8	769,0	680	700,9
082	810	727,4	750	911,0	776,6	755,8	772	697,3
083	1194	1115,4	1080	1191,8	1155,5	1060,8	1097	1092,5
084	879	829,8	820	1060,8	852,4	888,4	811	770,3

Serum	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
085	644	596,3	570	740,2	668,9	583,4	567	542,1
086	587	520,9	500	617,6	597,3	512,7	507	469,1
087	338	328,7	320	384,2	341,6	331,5	320	390,6
088	530	470,6	470	608,2	549,5	486,2	463	477,2
089	208	199,4	210	311,1	224,6	203,3	214	185,8
090	351	337,7	320	400,7	351,2	362,4	311	334,7
091	165	182,2	160	219,1	176,8	145,8	154	123,6
092	199	167,0	170	232,8	190,9	168,3	182	212,9
093	464	366,4	380	420,4	440,2	403,9	377	368,9
094	298	264,0	260	307,6	325,3	290,3	251	236,3
095	235	213,7	220	252,1	256,3	227,2	278	211,1
096	361	299,9	360	392,5	341,2	357,6	374	297,7
097	331	283,8	310	336,3	335,9	315,6	301	274,2
098	508	450,8	470	543,3	447,3	458,8	473	371,6
099	313	285,6	290	346,5	268,7	277,7	298	288,7
100	311	281,9	270	334,1	289,9	303,0	287	253,5
101	328	310,7	310	353,6	290,3	310,3	311	272,4
102	302	244,3	300	307,3	311,3	282,9	287	251,7
103	325	292,7	300	342,9	315,5	294,5	304	268,8
104	936	775,9	860	934,2	921,8	901,7	864	799,2
105	533	488,5	480	636,5	563,8	512,7	477	443,6
106	295	256,8	280	321,2	314,7	277,7	292	270,3

3.3. Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte im Rechenzentrum der Medizinischen Hochschule Hannover, Abteilung Biometrie. Es wurde nach dem Statistik-Programm-System für die Sozialwissenschaften (SPSS) gearbeitet[35]. SPSS ist ein integriertes System von Computerprogrammen zur statistischen Analyse von sozialwissenschaftlichen Daten, es findet aber auch häufig Anwendung in der Medizin und anderen Bereichen. Es setzt keine Kenntnisse einer Programmiersprache voraus und ermöglicht dadurch die Auswertung von Projekten ohne spezielle EDV-Kenntnisse.

Streuungsdiagramm

Ein Streuungsdiagramm oder Scattergram veranschaulicht den Zusammenhang zwischen zwei Variablen. Für jedes Serum werden die nach M1 (M2 - M7) ermittelten Werte den nach M8 erhaltenen Ergebnissen gegenübergestellt und in einem zweidimensionalen Koordinatensystem ausgedruckt. Jedes Wertepaar wird im Streuungsdiagramm durch ein Kreuz symbolisiert (+). Nehmen zwei oder mehrere Wertepaare die gleiche Position ein, so werden sie durch die entsprechende arabische Ziffer vertreten. Je enger die Punkte an einer gemeinsamen Geraden liegen, ein desto stärkerer Zusammenhang besteht zwischen beiden Variablen.

Zu jedem Scattergram werden noch folgende Werte angegeben:

Pearson'scher Korrelationskoeffizient[36]

Der Produktmoment-Korrelationskoeffizient r nach Bravais und Pearson ist eine Maßzahl für die Straffheit eines linearen Zusammenhanges zwischen zwei Variablen. Ist $r = 0$, so besteht kein linearer Zusammenhang. $r = 1$ bedeutet eine vollständige Übereinstimmung zwischen zwei Variablen. Alle Werte liegen auf einer Regressionsgeraden, sie weist keinerlei Streuung auf.

Bestimmtheitsmaß[36]

Das Quadrat des Korrelationskoeffizienten wird als Bestimmtheitsmaß r^2 bezeichnet. r^2 ist ein Maß für die

Abhängigkeit zweier Reihen von Variablen. Je geringer die Streuung der beobachteten Wertepaare um die Regressionsgerade ist, umso schärfer ist diese bestimmt, umso stärker ist die Abhängigkeit zwischen beiden Meßreihen, d.h. mit umso größerer Bestimmtheit läßt sich aus einem Wert x auf den zugehörigen Wert y schließen.

Gleichung der Regressionsgeraden[36)]

Besteht ein linearer Zusammenhang zwischen den Variablen, so streuen die Wertepaare um eine Gerade, die sog. Regressionsgerade. Sie läßt sich durch die allgemeine Geradengleichung $y = a + bx$ beschreiben.
a = Achsenabschnitt auf der Ordinate (intercept)
b = Steigung der Regressionsgeraden oder Regressionskoeffizient (slope)

In jedes Scattergram sind
a) die berechnete Regressionsgerade ————
b) die ideale Regressionsgerade --------
(für a = 0 und b = 1) eingezeichnet.

Tab.20: Pearson'scher Korrelationskoeffizient r und Bestimmtheitsmaß r^2 von M1 - M7 in Bezug auf M8

Methode	r	r^2
M1	0,9763	0,9531
M2	0,9870	0,9618
M3	0,9854	0,9711
M4	0,9723	0,9454
M5	0,9855	0,9711
M6	0,9790	0,9585
M7	0,9830	0,9663

Zum Vergleich der Methoden M1 - M7 untereinander siehe [37)].

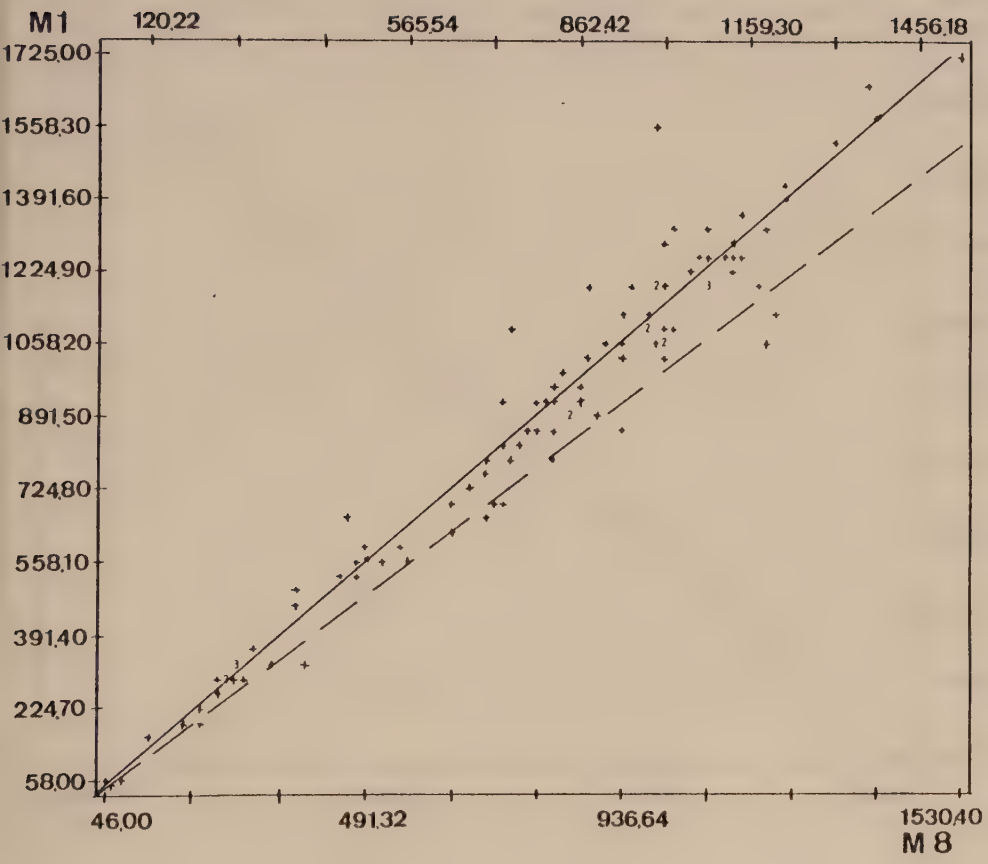


Abb.12 Scattergram M1 - M8

Pearson'scher Korrelationskoeffizient	$r = 0,9763$
Bestimmtheitsmaß	$r^2 = 0,9531$
y-Achsenabschnitt	$a = 12,40$
Steigung	$b = 1,13$
Gleichung der Regressionsgeraden	$y = 12,4 + 1,13x$

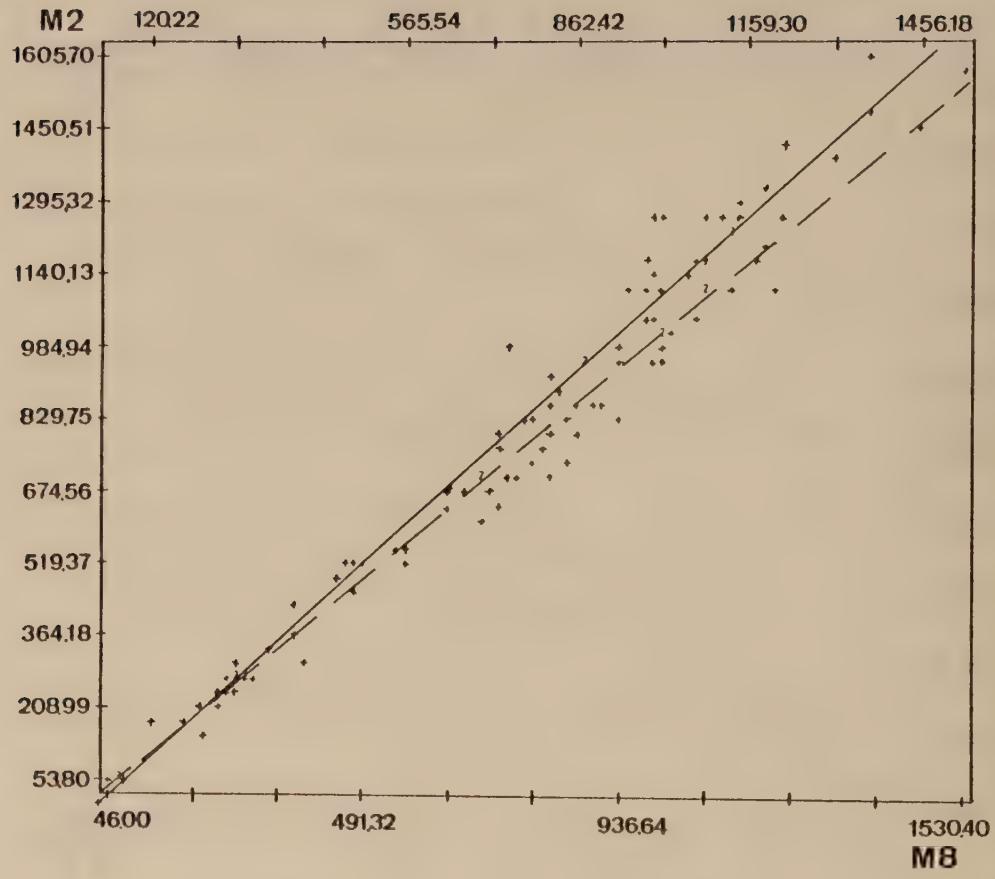


Abb.13 Scattergram M2 - M8

Pearson'scher Korrelationskoeffizient	r	= 0,9870
Bestimmtheitsmaß	r^2	= 0,9618
y-Achsenabschnitt	a	= -18,11
Steigung	b	= 1,09
Gleichung der Regressionsgeraden	y	= -18,1 + 1,09x

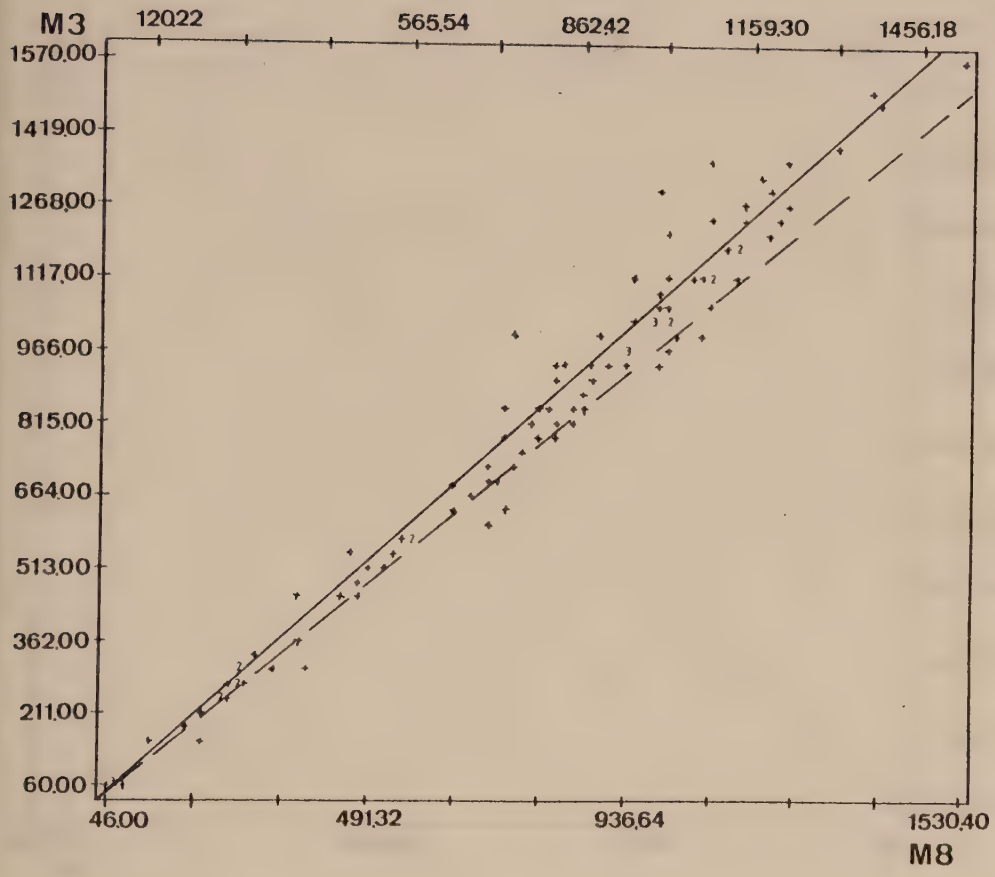


Abb.14 Scattergram M3 - M8

Pearson'scher Korrelationskoeffizient	r	=	0,9854
Bestimmtheitsmaß	r^2	=	0,9711
y-Achsenabschnitt	a	=	-2,97
Steigung	b	=	1,07
Gleichung der Regressionsgeraden	y	=	-2,97 + 1,07x

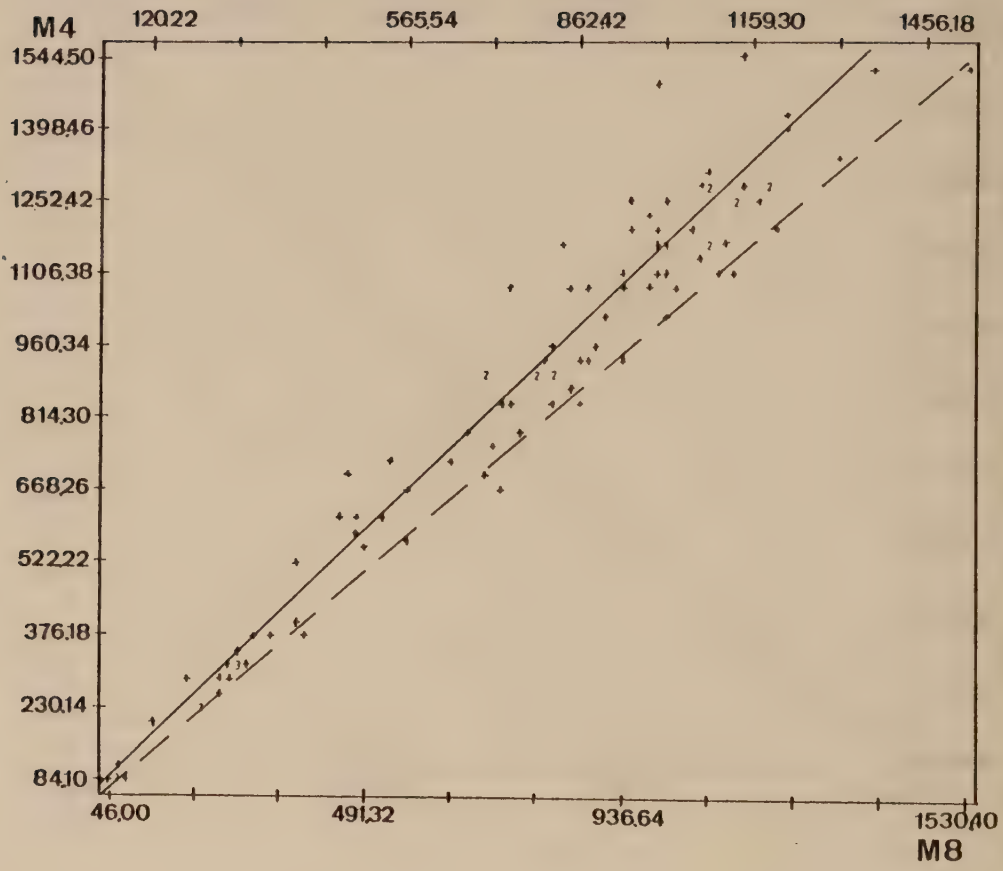


Abb.15 Scattergram M4 - M8

Pearson'scher Korrelationskoeffizient	r	=	0,9723
Bestimmtheitsmaß	r^2	=	0,9454
y-Achsenabschnitt	a	=	65,61
Steigung	b	=	1,08
Gleichung der Regressionsgeraden	y	=	65,61 + 1,08x

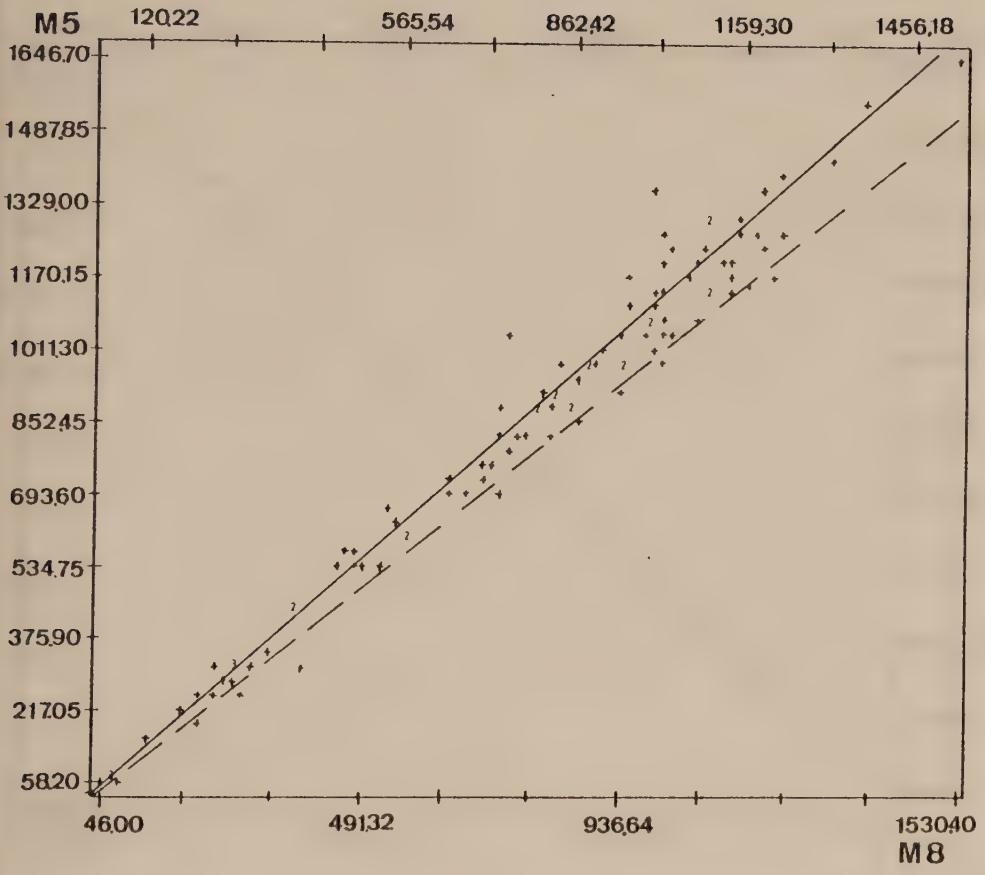


Abb.16 Scattergram M5 - M8

Pearson'scher Korrelationskoeffizient	r	= 0,9855
Bestimmtheitsmaß	r^2	= 0,9711
y-Achsenabschnitt	a	= 16,87
Steigung	b	= 1,09
Gleichung der Regressionsgeraden	y	= 16,87 + 1,09x

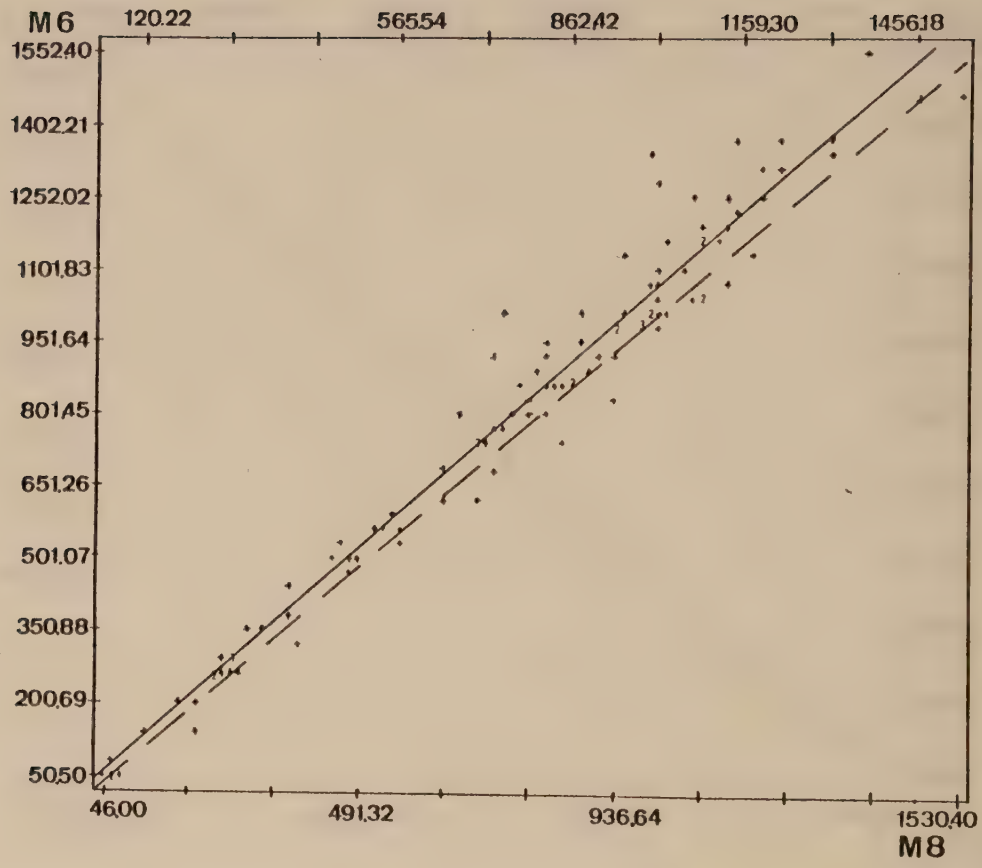


Abb.17 Scattergram M6 - M8

Pearson'scher Korrelationskoeffizient	r	= 0,9790
Bestimmtheitsmaß	r^2	= 0,9585
y-Achsenabschnitt	a	= 15,65
Steigung	b	= 1,05
Gleichung der Regressionsgeraden	y	= 15,65 + 1,05x

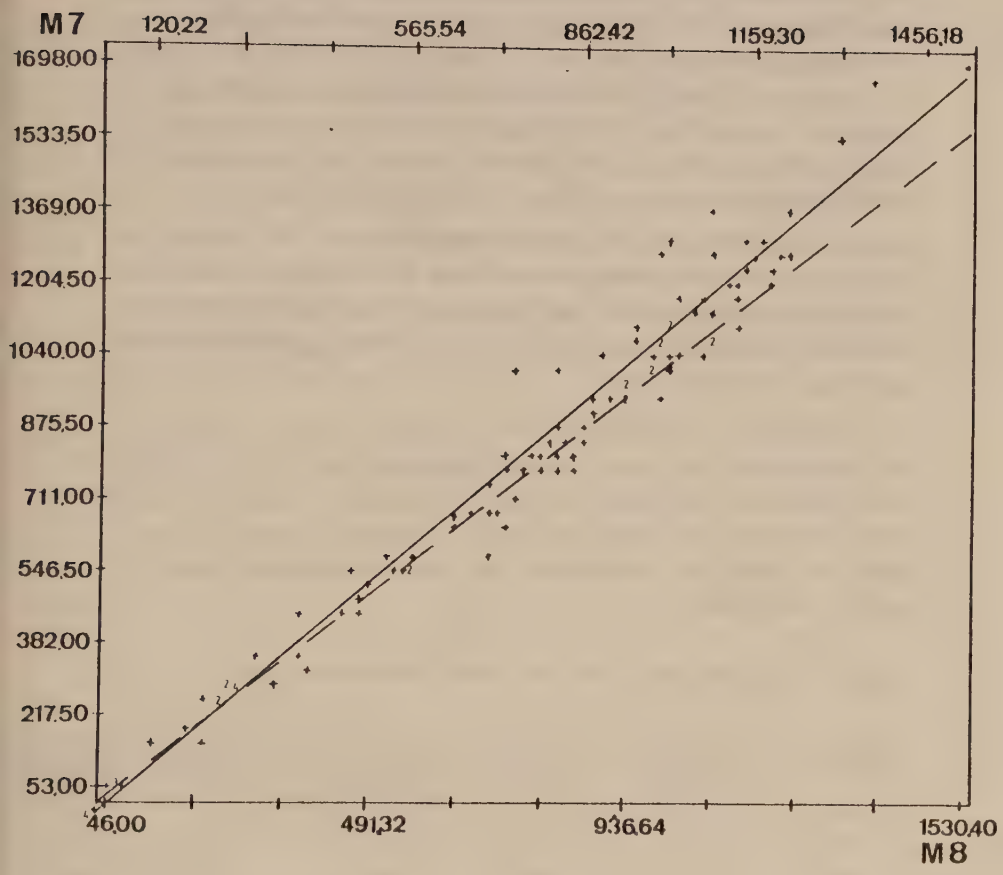


Abb.18 Scattergram M7 - M8

Pearson'scher Korrelationskoeffizient	r	= 0,9830
Bestimmtheitsmaß	r^2	= 0,9663
y-Achsenabschnitt	a	= -15,01
Steigung	b	= 1,10
Gleichung der Regressionsgeraden	y	= -15,01 + 1,10x

Zum Vergleich von Methoden sind noch folgende Daten von Bedeutung[36]:

Der Mittelwert (arithmetisches Mittel, engl. mean) ist die Summe aller Beobachtungen, geteilt durch die Anzahl aller Beobachtungen. Nur bei Normalverteilungen fällt der Mittelwert mit dem Kurvengipfel zusammen, bei schiefen eingipfeligen Verteilungen liegt das Maximum, also der größte Teil der Werte,rechts oder links vom Mittelwert. Zur Charakterisierung solcher Verteilungen wird der

Median (Zentralwert, Halbwert) herangezogen. Er ist derjenige beobachtete Wert in der nach der Größe der Einzelwerte geordneten Reihe, der die Reihe halbiert. Im Gegensatz zum arithmetischen Mittel bleibt der Median von Extremwerten unbeeinflußt.

Die Spannweite (Variationsbreite, engl. range) ist die Differenz zwischen dem größten (Maximum) und dem kleinsten Wert (Minimum) innerhalb einer Stichprobe. Dieses Streuungsmaß berücksichtigt aber nur die Extremwerte einer Reihe, über die Lage und Verteilung der mittleren Werte wird nichts ausgesagt.

Tab.21: Gegenüberstellung der statistischen Daten

Methode	Mittelwert (µmol/l)	Median (µmol/l)	Spannweite (µmol/l)	Minimum (µmol/l)	Maximum (µmol/l)
M1	871,2	936,5	1667,0	58,0	1725,0
M2	807,8	849,2	1551,9	53,8	1605,7
M3	811,2	871,0	1510,0	60,0	1570,0
M4	888,8	960,0	1460,4	84,1	1544,5
M5	847,3	919,0	1588,5	58,2	1646,7
M6	814,6	883,7	1501,9	50,5	1552,4
M7	818,7	869,5	1645,0	53,0	1698,0
M8	759,7	821,8	1482,6	47,8	1530,4

Der Auswertung liegen die Ergebnisse von 106 Proben zu Grunde.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen, daß der kombinierte Enzym-Jaffé-Farbtest M8 mit allen Vergleichsmethoden korreliert. Aus der Tabelle S. 66 sowie den Scattergramen ist ersichtlich, daß die Übereinstimmung um so besser ist, je spezifischer die jeweilige Vergleichsmethode ist. Es fällt auf, daß Mittelwert, Median und Extremwerte bei M8 deutlich niedriger liegen als bei M1 - M7. Es wäre zu überprüfen, ob der geringere Kreatiningehalt mit der längeren Lagerzeit der Proben vor Durchführung von M8 im Vergleich zu den Messungen nach M1 - M7 zu begründen ist.
Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Ergebnisse der Vergleichsversuche für die Richtigkeit der zu prüfenden Methode sprechen.

4. Ausarbeitung einer DIN-Vorschrift

Das im DIN-Entwurf 58 973[18)] vorgeschlagene Verfahren zur Bestimmung von Kreatinin im Serum oder Plasma sieht eine Jaffé-Reaktion nach Enteiweißung vor. Es wird durch Adsorption des Kreatinins an Fullererde (Lloyd's Reagens, natürlich vorkommendes Magnesium-Aluminium-Silikat) spezifisch gestaltet, denn die meisten Nicht-Kreatinin-Chromogene bleiben bei diesem Schritt in Lösung. Die Methode geht auf Arbeiten von Owen et.al.[8)] und Verbesserungen dazu durch Knoll und Stamm[9)] zurück.
Es soll untersucht werden, ob eine weitere Optimierung des Verfahrens möglich ist und gegebenenfalls ein neuer DIN-Entwurf entwickelt werden.

4.1. Beurteilung des DIN-Entwurfes 58 973

Gegenüber dem Vorschlag von Knoll und Stamm[9)] bietet der DIN-Entwurf folgende Vorteile:

- Die eingesetzten Volumina sind stark reduziert; dadurch vermindert sich der Bedarf an Probenmaterial um 75%.
- Der Zusatz einer gesättigten Oxalsäurelösung, sie soll eine Beschleunigung der Kreatinin-Adsorption an die Fullererde bewirken, entfällt, denn nach neueren Untersuchungen zeigen die Ergebnisse von Ansätzen mit und ohne Oxalsäurezusatz keine wesentlichen Unterschiede[38)].
- Insgesamt werden 5 Pipettierschritte eingespart. Das bedeutet neben verringertem Arbeitsaufwand vor allem weniger Fehlerquellen.
- Bedingt durch den steileren Verlauf der Eichgerade wird die Empfindlichkeit des Verfahrens verbessert.

Das im DIN-Entwurf vorgeschlagene Verfahren hat den Vorteil, im Vergleich zu anderen Methoden nach dem Jaffé-Prinzip weniger zeitabhängig zu sein; die Analyse kann vor Zugabe der alkalischen Pikratlösung unterbrochen werden, und die Messung der Extinktion kann während eines relativ großen Zeitraumes erfolgen. Darin wird den

Anforderungen des klinischen Routinelabors Rechnung getragen, ebenso in der Wahl der drei möglichen Meßwellenlängen: vorgesehen sind die Hg-Linien 486 nm oder 492 nm sowie die Cd-Linie 509 nm. Ein Spektralphotometer ist also nicht erforderlich.
Der DIN-Entwurf schreibt eine Desorption des Kreatinins von der Fullererde mit 500 µl alkalischer Pikratlösung vor. Die Konzentrationen im Endansatz betragen

12,4 mmol/l Pikrinsäure
0,155 N Natronlauge.

Im Vergleich zu anderen Methoden fällt die hohe Pikrinsäurekonzentration auf. Sie wird durch den vorgeschalteten Enteiweißungsschritt ermöglicht (in eiweißhaltigem Probenmaterial würde sie zu Ausfällungen führen), und sie ist verantwortlich für die kurze Reaktionszeit und den vergleichsweise hohen $E^{1\%}_{1cm}$- Wert. Die Konzentration der Natronlauge stimmt mit anderen Modifikationen der Jaffé-Reaktion überein. Der pH-Wert im Endansatz beträgt 12,8.

Arbeitsvorschrift des DIN-Entwurfes 58 973

1) Enteiweißung

200 µl H_2SO_4 0,165 mol/l
100 µl Probe (Serum, Standard oder Wasser)
100 µl Natriumwolframatlösung 5%
400 µl

3 min. schütteln (z.B. Rotationsmischer)
2,5 min. zentrifugieren

2) Adsorption

300 µl Überstand der Enteiweißung
500 µl Fullererde-Suspension 6 g/l

1 min. mischen
2,5 min. zentrifugieren
Überstand quantitativ absaugen und verwerfen

3) Jaffé-Reaktion

Niederschlag
500 µl alkalische Pikratlösung
(12,4 mmol/l Pikrinsäure und 0,155 N Natronlauge)

bis zur vollständigen Resuspendierung schütteln und
30 min. stehenlassen,
2,5 min. zentrifugieren
und innerhalb von 30 min. messen bei 486, 492 oder 509 nm.

Standard- und Serumproben sowie der Reagenzienleerwert werden gegen Wasser gemessen; die Kalibrierung erfolgt über eine Arbeitsstandardlösung mit 177 µmol/l = 2 mg/100ml Kreatinin.

4.2. Kombination der Fullererde-Methode mit dem optimierten Jaffé-Farbtest

Bei Bestimmungen nach der Fullererde-Methode wird das Kreatinin mit alkalischer Pikratlösung desorbiert und das Jaffé-Reaktionsprodukt zur quantitativen Auswertung herangezogen. Es soll die Farbstoffausbildung bei den Modifikationen nach DIN-Entwurf und nach Schmid[17] verglichen werden um zu prüfen, ob durch letztere eine weitere Optimierung des Verfahrens möglich ist.

Durchführung

Es wurden zwei Meßreihen durchgeführt zur Erstellung von Eichgeraden für beide Modifikationen. Als Untersuchungsmaterial wurde für alle Bestimmungen künstliches Serum eingesetzt.

Meßreihe 1

Durchführung aller Analysen nach den Vorschriften des DIN-Entwurfes und Messung der Extinktion bei 486, 492 und 509 nm. Es wurde jeweils 5 Minuten zentrifugiert.

Meßreihe 2

Übertragung der Modifikation nach Schmid auf den DIN-Entwurf:

1) Enteiweißung des Serums und Adsorption des Kreatinins an Fullererde wie in DIN-Entwurf 58 973.
2) Bestimmungsansatz
   Zum Niederschlag aus dem vorausgegangenen Adsorptionsschritt werden 400 µl auf 30°C temperierte alkalische Pikratlösung pipettiert. Danach wird bis zur vollständigen Resuspendierung des Niederschlages geschüttelt (z.B. mit einem Rotationsmischer), der Ansatz in einem Wasserbad von 30°C stehen gelassen, bis 5-10-15 Minuten seit Zugabe der Pikratlösung verflossen sind, und dann 5 Minuten zentrifugiert. Dem Überstand werden 200 µl auf 30°C temperierte Natriumdihydrogenphosphatlösung zugesetzt. Genau 2 Minuten nach Zugabe erfolgt die photometrische

Messung bei 484 nm. Der Küvettenhalter ist auf 30°C zu temperieren.

Meßvorgang: vergl. DIN-Entwurf 58 973

Abweichend vom DIN-Entwurf sind folgende Reagenzien erforderlich:

Alkalische Pikratlösung: Pikrinsäurelösung (7 mmol/l) und Natronlauge (1 N) werden im Verhältnis 1:1 gemischt,

Natriumdihydrogenphosphatlösung: es wird eine 9%ige Lösung von $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ in Wasser hergestellt.

Tab.22 Meßreihe 1

Kreatinin (mg/100ml)	gemessene Extinktionsdifferenz bei 486 nm	492 nm	509 nm
1	0,122	0,127	0,112
2	0,249	0,246	0,222
4	0,484	0,498	0,434
8	0,971	0,991	0,855

Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Messungen angegeben.

Gleichung der Eichgeraden:

486 nm: $y = 0,121x + 0,003$

492 nm: $y = 0,124x + 0,002$

509 nm: $y = 0,106x + 0,008$

Tab.23: Berechnung der $E^{1\%}_{1cm}$-Werte

	$E^{1\%}_{1cm}$
486 nm	620
492 nm	630
509 nm	570

Tab.24: Meßreihe 2

Kreatinin (mg/100ml)	bei 484 nm gemessene Extinkionsdifferenz nach einer Reaktionszeit von insgesamt			
	10 min	15 min	20 min	Mittelwert
1	0,126	0,141	0,125	0,131
2	0,258	0,252	0,261	0,257
4	0,517	0,523	0,523	0,512
8	1,004	0,980	0,991	0,992

Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Messungen angegeben. Die Reaktionszeit setzt sich zusammen aus der Inkubationszeit im Wasserbad (5-10-15 Minuten) und der Zentrifugierzeit (5 Minuten).
Es wurden verschiedene Reaktionszeiten gewählt, um die Zeitabhängigkeit des Desorptionsschrittes sowie der Ausbildung des Jaffé-Reaktionsproduktes zu untersuchen. Nach Schmid sind 5 Minuten ausreichend, hier ist aber zusätzlich die für die Desorption des Kreatinins von der Fullererde erforderliche Zeit zu berücksichtigen. Die Ergebnisse zeigen, daß eine Reaktionszeit von 10 Minuten nicht überschritten werden muß, eine Extinktionszunahme ist danach nicht mehr zu erwarten.

Gleichung der Eichgeraden (berechnet aus den Meßwerten nach einer Reaktionszeit von 10 Minuten):

$$y = 0{,}125x + 0{,}007$$

Berechnung von $E_{1cm}^{1\%}$:

$$E_{1cm}^{1\%} = 792$$

Auswertung:

Die für die Modifikation der Jaffé-Reaktion nach Schmid ermittelte spezifische Extinktion liegt im Vergleich zu den nach dem DIN-Entwurf ermittelten Werten um 28% (486 nm),

26% (492 nm) bzw. 40% (509 nm) höher. Das wirkt sich aber kaum auf die Steigung der Eichgeraden aus, denn das Endvolumen ist ebenfalls um 20% erhöht worden. Eine größere Steigung der Eichgeraden und eine weitere Zunahme der Empfindlichkeit ließe sich zwar durch eine Verminderung der eingesetzten Volumina an alkalischer Pikratlösung und Natriumdihydrogenphosphatlösung erreichen, es ist aber zu überlegen, ob das überhaupt wünschenswert ist: Mit $b \approx 0{,}13$ liegt die Steigung der Eichgeraden in einem sehr günstigen Bereich, denn einmal bedeutet das eine genügend große Empfindlichkeit, zum anderen ist die Methode bis zu recht hohen Kreatininkonzentrationen (mindestens 10 mg/100ml) linear.

Ein Nachteil der Modifikation nach Schmid ist ihre starke Zeitabhängigkeit[17], die Reaktionszeiten sind genau einzuhalten, besonders nach Zugabe der Natriumdihydrogenphosphatlösung, denn es ist dann eine stetige Extinktionsabnahme in Abhängigkeit von der Zeit zu beobachten. Es ist hier also nicht möglich, die Durchführung der Analyse zu unterbrechen. Dagegen gestattet es der DIN-Entwurf, die Messung zu einem beliebigen Zeitpunkt in einem Intervall von 30 Minuten durchzuführen, das heißt, der gebildete Farbstoff ist relativ stabil.

Ferner erfordert die Modifikation nach Schmid ein genaues Einhalten der Reaktionstemperatur von $30^{\circ}C$, ein thermostatisierbares Wasserbad sowie ein temperierter Küvettenhalter sind erforderlich. Dagegen gestattet der DIN-Entwurf das Arbeiten bei einem Temperaturintervall von $23 \pm 5^{\circ}C$, entsprechend der Raumtemperatur.

Es ist auch zu berücksichtigen, daß bei Zugabe der Natriumdihydrogenphosphatlösung zum Zentrifugat u.U. Bodensatz aufgewirbelt werden kann. Diese Partikel bewirken dann eine Lichtstreuung bei der Messung und führen zu falschen Ergebnissen. Diese Schwierigkeit ließe sich umgehen, wenn 500 µl (statt 400 µl) alkalische Pikratlösung eingesetzt, vom Zentrifugat 400 µl abpipettiert und nach Zusatz von 200 µl Natriumdihydrogenphosphatlösung als Meßansatz

verwendet werden. Dieses Vorgehen führt zu einem weiteren Pipettierschritt, und der $E^{1\%}_{1cm}$- bzw. der ϵ-Wert sinken um 20% (es werden nur 80% des Überstandes weiterverarbeitet), d.h. die Eichgerade verläuft flacher. Eine andere Fehlerquelle wird aber gleichzeitig ausgeschaltet: Es ist nicht zu erwarten, daß beim Zentrifugieren jedesmal exakt 400 µl Überstand zurückgewonnen werden. Schwankt dieses Volumen, so streuen zwangsläufig die Meßergebnisse bei verschiedenen Untersuchungen derselben Probe, es wird ein zu niedriger Kreatiningehalt gefunden.
Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Modifikation der Jaffé-Reaktion nach Schmid zur Optimierung des DIN-Entwurfes nicht geeignet ist.

4.3. DIN-Entwurf mit dem entwickelten Enzym-Jaffé-Farbtest

Auf Grund dieser Untersuchungsergebnisse (4.3.) und den Arbeiten an einem kombinierten Enzym-Jaffé-Farbtest wurde der folgende DIN-Vorschlag zur Bestimmung von Kreatinin im Serum oder Plasma entwickelt. Der Entwurf stimmt mit der auf S.42 beschriebenen Arbeitsvorschrift überein.

Bestimmung von Kreatinin (2-Amino-1,5-dihydro-1-methyl-imidazol-4-on) im Serum oder Plasma mit einem kombinierten Enzym-Jaffé-Farbtest

1) Zweck

Durch Anwendung der in diesem Norm-Entwurf enthaltenen Festlegungen wird sichergestellt, daß die Ergebnisse der entsprechenden Bestimmungen dieses Bestandteils der Blutflüssigkeit richtig und präzise und damit vergleichbar[+)] sind.

2) Mitgeltende Normen

DIN 1301 Teil 1 Einheiten; Einheitennamen, Einheitenzeichen

[+)] Vergleichbarkeit siehe DIN 58 936 Teil 1

DIN 1301 Teil 2	Einheiten; allgemein angewendete Teile und Vielfache
DIN 12111	Prüfung von Glas; Grießverfahren zur Prüfung der Wasserbeständigkeit von Glas als Werkstoff bei 98°C und Einteilung der Gläser in hydrolytische Klassen
DIN 32625	(z.Z. noch Entwurf) Größen und Einheiten in der Chemie; Stoffmenge und davon abgeleitete Größen, Begriffe und Definitionen
DIN 58963 Teil 2	Küvetten für photometrische Messungen von Flüssigkeiten im ultravioletten, sichtbaren und nahen infraroten Spektralbereich; Anforderungen an Rechteck- und Zylinderküvetten.

3) Begriff

Kreatinin $C_4H_7N_3O$ entsteht im Muskelgewebe irreversibel aus Kreatinphosphat und wird als Stoffwechsel-Endprodukt über die Nierenglomerula ohne Rückresorption durch die Nierentubuli ausgeschieden. Die Bestimmung der Kreatininkonzentration im Serum oder Plasma gilt als empfindlicher Indikator für eine Nierenfunktionsstörung.

4) Einheiten

Es gelten DIN 1301 Teil 1 und 2.
Für Einheiten die mit der SI-Basisgröße Stoffmenge und deren Basiseinheit mol in Zusammenhang stehen, gilt zusätzlich DIN 32625.
Die Stoffmengenkonzentration des Kreatinins wird in Mikromol durch Liter, Einheit /umol/l,
die Massenkonzentration gewöhnlich in Milligramm durch Deziliter, Einheit: mg/dl angegeben.

5. Definition der Methode

5.1. Prinzip der Methode

Kreatinin wird im Ansatz Probenleerwert durch Creatinin-Amidohydrolase und mehrere nachgeschaltete enzymatische Reaktionen vollständig über Kreatin zu Kreatinphosphat umgesetzt. Nach Zugabe von alkalischer Pikratlösung bildet sich in Probe und Probenleerwert ein orange-roter Farbstoff, es stellt sich ein Gleichgewicht ein zwischen zwei Meisenheimer-Salzen, einem 2,4,6-Trinitrocyclohexadienat-Salz und einem Propenid-Addukt. Durch Zugabe von Pufferlösung wird der pH-Wert abgesenkt und das Gleichgewicht vollständig zugunsten des 2,4,6-Trinitrocyclohexadienat-Salzes verschoben, sein Absorptionsmaximum liegt bei 484 nm. Diese Verbindung wird zur quantitativen photometrischen Messung herangezogen, die Extinktionsdifferenz entspricht der Kreatininkonzentration im Serum[16,17,39]:

$$\Delta E(\text{Kreatinin}) = E_1(\text{Kreatinin + Chromogene}) - E_2(\text{Chromogene})$$

5.2. Reaktionsbedingungen

5.2.1. Temperatur

Eine Temperatur von 30°C ist während der ganzen Analyse einzuhalten.

5.2.2. Konzentrationen im Reaktionsansatz

	vor-	nach Pufferzugabe
Natriumhydroxyd	0,5	0,33 mol/l
Pikrinsäure	3,5	2,3 mmol/l

5.3. Spezifität

Kreatin (Konzentrationen bis 100 µmol/l ≙ 1,5 mg/100ml wurden geprüft), Glucose (Konzentrationen bis 55,5 mmol/l ≙ 1000 mg/100ml wurden geprüft), Hydantoin (Konzentrationen bis 500 µmol/l ≙ 5 mg/100ml wurden geprüft), Aceton (Konzentrationen bis 860 µmol/l ≙ 5 mg/100ml wurden geprüft), Ascorbinsäure (Konzentrationen bis 285 µmol/l ≙ 5 mg/100ml

wurden geprüft), Bilirubin (Konzentrationen bis 342 µmol/l ≙ 20 mg/100ml wurden geprüft) und Natriumpyruvat (Konzentrationen bis 455 µmol/l ≙ 5 mg/100ml wurden geprüft) stören das Bestimmungsverfahren nicht.

5.4. Untere Nachweisgrenze und Linearität

Untere Nachweisgrenze: 5,4 µmol/l (≙ 0,061 mg/100ml)
Linearität: In künstlichem Serum besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen Extinktion und Konzentration bis zu mindestens 1415 µmol/l ≙ 16 mg/100ml Kreatinin.
(künstliches Serum: Albuminkonzentration 0,63 mmol/l ≙ 4,2 g/100ml)

5.5. Wiederfindung

Die Wiederfindungsrate nach der Zumischmethode in Seren mit bekanntem Kreatiningehalt betrug 100,0 ± 0,2% und bei der Mischung dieser Seren untereinander 100,0 ± 0,5%.

6. Geräte

6.1. Photometer

Das Gerät muß über einen temperierbaren Küvettenhalter verfügen, die Messung von Extinktionsdifferenzen zulassen, d.h. Messung von Probe und Probenleerwert nebeneinander, das Gerät muß für die Messung bei 484 nm geeignet sein.

6.2. Küvetten

Es sind Halbmikro-Einmalküvetten oder -Quarzküvetten zu verwenden, entsprechend den Anfoderungen der DIN-Vorschriften.

6.3. Rotationsmischer

6.4. Kolbenhubpipetten

6.5. Wasserbad

Es muß auf 30°C thermostatisierbar sein und über einen Einsatz für Reaktionsgefäße verfügen.

7. Reagenzien

7.1. Grundsubstanzen

Kreatinin
Pikrinsäure (in Lösung 7 mmol/l)
Natriumhydroxyd (in Lösung 1 mol/l)
Natriumdihydrogenphosphat (in Lösung 9%)
Wasser
Creatinin-Amidohydrolase-Lösung (1)
Enzymmischung aus CK, PK, LDH (2)
Substratmischung aus NADH, ATP, PEP (3)
(1,2,3) in Zusammensetzung und Aktivität entsprechend Test-Kombination Creatinin enzymatisch Boehringer Mannheim, Best.Nr. 166 413.

7.2. Herstellung der Reagenzienlösungen

7.2.1. Standardlösung

7.2.2. Enzym-Substratmischung

Herstellung der Enzym- und der Substratmischung nach Herstellerangaben, gekühlt haltbar bis zu 2 Wochen. 1 Volumteil Enzymlösung, 1 Volumteil Substratlösung und 8 Volumteile Wasser werden gemischt, die Enzym-Substrat-Mischung ist bei Raumtemperatur ca. 3 Stunden haltbar.

7.2.3. Alkalische Pikratlösung

Je ein Volumteil Pikrinsäurelösung (7 mmol/l) und Natronlauge (1 mol/l) werden gemischt.

7.2.4. Pufferlösung

9 g Natriumdihydrogenphosphat werden mit Wasser zu 100,0 ml gelöst.

8. Probennahme

vergl. DIN-Entwurf 58973

9. Durchführung der Bestimmungen

	Probe (/ul)	Referenz (/ul)
wäßr.Kreatininlsg. bzw. Serum	50	50
Enzym-Substrat-Mischung	50	50
Creatininase	--	5
Glycerinlsg. 3,5%	5	--
Inkubationszeit 10 Minuten bei 30°C		
Natronlauge 1 N	200	200
Pikrinsäurelsg. 14 mmol/l	100	100
Inkubationszeit 5 Minuten bei 30°C		
Natriumdihydrogen-phosphatlsg. 9%	200	200
nach 2 Minuten Messung bei 484 nm bei 30°C		

10. Ergebnis

10.1. Berechnung

Die Kreatininkonzentration in mg/100ml wird berechnet nach

$$c = \Delta E \cdot F$$

und in /umol/l nach

$$c = \Delta E \cdot F \cdot 88{,}4$$

F = Steigung der mit Standardlösungen zu ermittelnden Eichgerade (0,0975)

Δ E = Extinktionsdifferenz, gemessen bei 484 nm

c = Konzentration Kreatinin im Untersuchungsmaterial.

10.2. Normbereich

Männer 57 bis 92 µmol/l entspr. 0,64 bis 1,04 mg/dl,
Frauen 50 bis 81 µmol/l entspr. 0,57 bis 0,95 mg/dl.

11. Bewertung und Aussagefähigkeit

Bei der Bestimmung von Tag zu Tag beträgt der Variationskoeffizient 3,2% bei einem Serum mit 181 µmol/l ≙ 2,05 mg/100ml Kreatinin.

5. Bestimmung von Kreatinin im Urin

Die Bestimmung von Kreatinin im Urin hat in der klinischen Chemie eine große Bedeutung. Sie wird zur Kontrolle der Vollständigkeit von 24-Stunden-Urinsammlungen herangezogen, denn die Kreatininausscheidung pro kg Körpergewicht ist während 24 Stunden recht konstant. Viele Labors geben deswegen ihre Meßergebnisse in Einheiten/mg Kreatinin an[2].

Als Kreatininkoeffizient für Erwachsene werden folgende Werte angegeben[2]:

Männer: 9 - 25 mg/kg Körpergewicht/24 h
Frauen: 7 - 21 mg/kg Körpergewicht/24 h

5.1. Anwendung der Methode Schmid für Bestimmungen im Urin

Es ist zu erwarten, daß sich die Methode von Schmid für die Bestimmung von Kreatinin im Urin eignet. Im Gegensatz zum Plasma enthält der Urin kein Kreatin, denn es unterliegt in der Niere einer vollständigen Rückresorption[2]. Damit entfällt der Störfaktor für die Bestimmung (vergl. Bestimmung im Serum), und mit einer Verfälschung der Meßergebnisse ist deswegen nicht zu rechnen.

Untersuchungsmaterial: Urin, 1:100 mit Wasser verdünnt
Durchführung: Alle Messungen wurden nach der Arbeitsvorschrift S. 18 durchgeführt.

Erstellen einer Eichgerade

Zum Erstellen einer Eichgerade wird drei Urinproben von unterschiedlicher Kreatininkonzentration Kreatinin zugesetzt. In Tab.25 sind jeweils die Mittelwerte aus drei Messungen angegeben.

Auswertung: Die Ergebnisse der Zumischversuche stimmen bei allen drei Proben überein. Daraus ergibt sich eine Eichgerade mit der Gleichung

$$y = 0{,}122\ x$$

Eichgerade siehe Abb.19, S.92

Tab.25: Meßwerte zur Erstellung einer Eichgerade

zugesetztes Kreatinin (mg)	Probe I		Probe II		Probe III	
	E	ΔE	E	ΔE	E	ΔE
0	0,212		0,101		0,142	
0,5	0,274	0,062	0,161	0,060	0,203	0,061
1	0,335	0,061	0,223	0,062	0,263	0,060
2	0,456	0,121	0,346	0,123	0,385	0,122
3	0,578	0,122	0,470	0,124	0,506	0,121

Die Bestimmung von Kreatinin im Serum wird durch die Anwesenheit von Kreatin gestört. Nach Richterich[2] unterliegt Kreatin zwar einer praktisch vollständigen Rückresorption, trotzdem soll experimentell bewiesen werden, daß keine Störung für Messungen im Urin zu erwarten ist.

Versuchsanordnung:
Der Kreatiningehalt zweier Urinproben wird
1. nach Schmid (1 mg Kreatinin ≙ E = 0,122)
2. nach der verbesserten Methode Schmid, Arbeitsvorschrift S. 42

bestimmt. Bei 2.) schließt die Versuchsanordnung Störungen durch Kreatin aus, und Kreatinin wird zu 100% erfaßt.

Tab.26: Vergleichende Bestimmungen von Kreatinin im Urin nach zwei Methoden

	Methode Schmid		verbesserte Methode	
	E	Kreatinin (mg)	E	Kreatinin (mg)
Probe 1	0,120	0,98	0,096	0,97
Probe 2	0,210	1,72	0,171	1,73

Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Messungen angegeben.

Auswertung:
Die Analysenergebnisse stimmen nach beiden Methoden überein. Daraus ergibt sich, daß die Methode Schmid für Bestimmungen im Urin anwendbar ist, das Nachschalten weiterer Enzyme erübrigt sich.

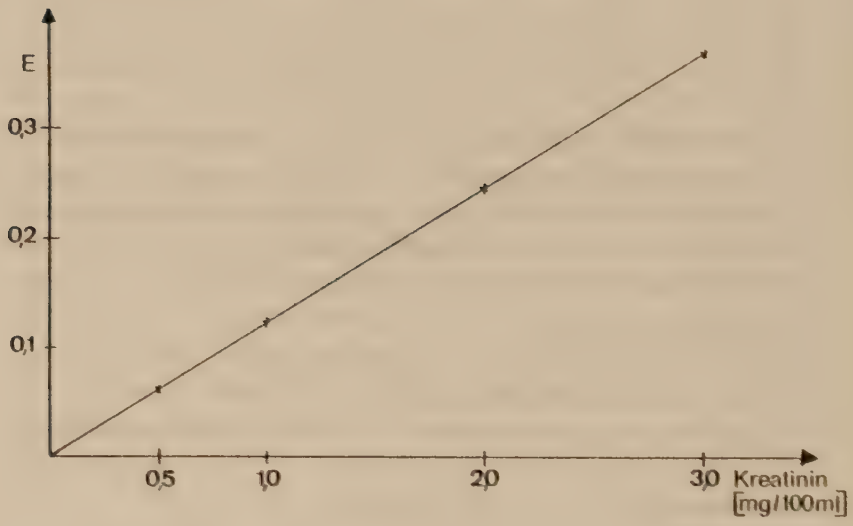


Abb.19 Eichgerade für die Bestimmung von Kreatinin im Urin mit dem enzymatischen Farbtest im Mikromaßstab
Gleichung der Eichgeraden: $y = 0,122x$

5.2. Vergleich des enzymatischen Farbtestes mit der "Methode Merck"

Bei der Methode Merck handelt es sich um ein kinetisches Verfahren auf der Basis der Jaffé-Reaktion. Eine Enteiweißung ist nicht erforderlich. Das Verfahren geht davon aus, daß die Extinktionszunahme in den ersten Minuten der Reaktion proportional der Kreatininkonzentration im Untersuchungsmaterial ist und störende Nebenreaktionen durch Chromogene erst später einsetzen als die Reaktion des Kreatinins mit der alkalischen Pikratlösung. Als Berechnungsstandard wird in jeder Analysenserie eine wäßrige Kreatininlösung mitgeführt[1,40,41].

Untersuchungsmaterial: Harn 1:100 mit Wasser verdünnt
Durchführung nach Packungsbeilage Merckotest^{R} Kreatinin[41]
Messung bei 492 nm, Meßtemperatur 30°C

Berechnung der Kreatininkonzentration:

$$\frac{E_2\ (\text{Probe}) - E_1\ (\text{Probe}) - 0{,}006}{E_2\ (\text{Standard}) - E_1\ (\text{Standard}) - 0{,}006} \quad \left[\text{mg}/100\text{ml}\right]$$

Für den Standard wurde die Extinktionsdifferenz $\Delta E = 0{,}103$ bestimmt.
Eine Blindlösung aus Wasser, Pufferlösung und Pikrinsäurelösung zeigte im Meßintervall eine Extinktionszunahme von $\Delta E = 0{,}006$. Deswegen wurde dieser Wert jeweils abgezogen.
Für die Berechnung ergibt sich damit:

$$\frac{\Delta E\ (\text{Probe}) - 0{,}006}{0{,}097}$$

Die Bestimmungen mit dem enzymatischen Farbtest wurden nach der Arbeitsvorschrift S. 18 ausgeführt.
Für alle Messungen sind die Mittelwerte aus zwei Bestimmungen angegeben.
Als Untersuchungsmaterial wurde Urin aus 24-Stunden-Sammlungen verwendet, Verdünnung mit Wasser 1:100.
Die Ergebnisse sind in Tab.27 zusammengestellt.

Tab.27: Vergleichende Bestimmungen nach dem enzymatischen Test und nach der Methode Merck

Nr.	enzym.Test Kreatinin (mg/100ml)	Merck Kreatinin (mg/100ml)
1	0,71	0,74
2	1,87	2,07
3	0,70	0,76
4	1,45	1,55
5	1,51	1,56
6	0,80	0,86
7	0,76	0,83
8	0,52	0,56
9	0,84	0,95
10	0,89	0,96
11	1,48	1,53
12	0,98	1,04
13	0,71	0,77
14	0,93	0,97
15	0,79	0,82
16	0,68	0,76
17	0,76	0,78
18	0,75	0,78
19	1,84	1,97
20	1,47	1,58
21	0,93	1,05
22	0,90	0,98
23	0,98	1,08
24	1,40	1,52
25	0,85	0,95
26	1,12	1,13
27	1,11	1,16

Durch die statistische Berechnung ist die Korrelation zwischen den beiden Methoden wie folgt gekennzeichnet:

Korrelationskoeffizient: $r = 0,9924$

Regressionsgerade: $y = 0,9305 x + 0,0032$

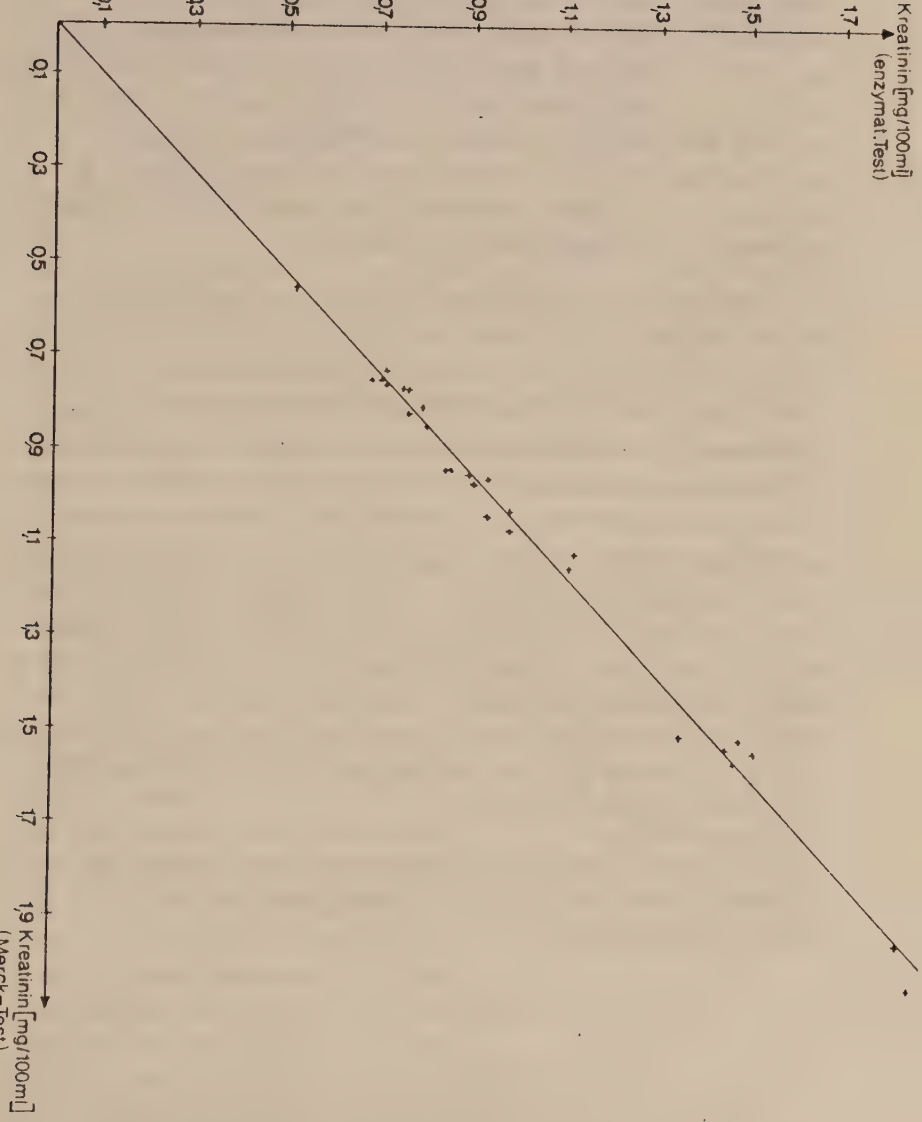


Abb.20 Regression der Kreatininkonzentration im Urin, bestimmt mit dem enzymatischen Farbtest, auf die mit der Methode Merck bestimmten Kreatininwerte.

Auswertung

Das Ergebnis zeigt, daß der enzymatische Farbtest und die "Methode Merck" korrelieren. Allerdings liegen die Werte nach dem neuen Verfahren um ca. 7% niedriger als die mit der kinetischen Methode ermittelten. Das entspricht aber den Erwartungen, denn die Methode Merck schließt den Einfluß von Chromogenen nicht vollständig aus, und sie verwendet außerdem eine wäßrige Lösung und kein Untersuchungsmaterial als Vergleich.

In einem weiteren Parallelversuch sollte geprüft werden, in welchem Maß die Methode Merck den Einfluß von Chromogenen ausschließt. Dazu wurde die Arbeitsvorschrift des enzymatischen Farbtests folgendermaßen abgewandelt:

- Austausch von Creatininase gegen wäßrige Glycerinlösung
- Verwendung von Wasser anstelle von Analysenmaterial auf der Referenzseite

Man erfaßt dabei also das gesamte Kreatinin und die Chromogene. Nach Umrechnung auf den enzymatischen Farbtest ergeben sich Kreatininwerte, die immer höher als die nach der üblichen Arbeitsvorschrift ermittelten sind und, von wenigen Ausnahmen abgesehen, auch über den Werten nach Methode Merck liegen. Das beweist, daß das kinetische Verfahren nur einen Teil der Chromogene ausschließt und zu zu hohen Kreatininwerten führt.

Dieses Ergebnis deckt sich auch mit Beobachtungen von E.Henkel, Hannover, daß die Methode Merck um ca. 5% zu hohe Werte liefert[+)].

[+)] Mitteilung von E.Henkel, Hannover

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird eine Kreatininbestimmung im Mikromaßstab beschrieben, die die Spezifität enzymatischer Verfahren mit der Schnelligkeit des Jaffé-Tests verbindet und die Anforderungen an Richtigkeit und Präzision erfüllt. Die Methode stellt eine Verbesserung des von M.Schmid (Dissertation, Tübingen 1978) entwickelten Enzym-Jaffé-Farbtests dar. Es konnte gezeigt werden, daß die unterschiedlich hohe Kreatinkonzentration in Patientenseren der Grund für die fehlende Korrelation zwischen dem Verfahren nach M.Schmid und anderen gebräuchlichen Methoden ist. Da Creatinin-Amidohydrolase die Gleichgewichtseinstellung zwischen Kreatinin und Kreatin von beiden Seiten katalysiert - äquimolare Mengen Kreatinin und Kreatin ergeben nach Einwirkung des Enzyms im Jaffé-Test eine gleich starke Farbstoffausbildung -, wird die Eichgerade zur Kreatininbestimmung bei steigender Kreatinkonzentration parallel unter Schneidung der y-Achse bei negativen Werten verschoben. Der Fehler ließ sich durch Zusatz weiterer Enzyme und Substrate (Creatin-Kinase (CK), Pyruvat-Kinase (PK), Lactatdehydrogenase (LDH) und NADH, ATP, PEP) beheben. Kreatin wird dadurch in Kreatinphosphat überführt, und seine Entfernung aus dem Reaktionsgleichgewicht Kreatinin-Kreatin bewirkt eine vollständige Umsetzung des Kreatinins. Unter Ausnutzung der so um ca. 64% gesteigerten Empfindlichkeit der Farbreaktion und dem Einsatz von Halbmikroküvetten gelang es, das erforderliche Probenvolumen von 1000 µl auf 100 µl zu senken. Daraus ergab sich eine neue Arbeitsvorschrift für einen Enzym-Jaffé-Farbtest im Mikromaßstab (vergl. Arbeitsvorschrift S.42).

Zur Beurteilung seiner Qualität wurde der neue Test einer eingehenden Prüfung unterzogen:

Die Eichgerade verläuft linear mindestens bis zu einer Kreatininkonzentration von 16 mg/100ml ≙ 1415 µmol/l.

Eine Beeinflussung der Meßergebnisse durch Chromogene konnte nicht beobachtet werden. Glucose, Hydantoin, Aceton, Ascorbinsäure, Bilirubin, Natriumpyruvat und Kreatin stören

in den angegebenen Konzentrationen, jeweils einem Mehrfachen ihrer Normalwerte im Serum, nicht.
Zur Beurteilung der Richtigkeit wurden Zusatz-,Misch- und Vergleichsversuche durchgeführt. Die Wiederfindungsrate nach der Zumischmethode in Seren mit bekanntem Kreatiningehalt betrug 100,0 $\pm$ 0,2% und bei der Mischung dieser Seren untereinander 100,0 $\pm$ 0,5%. Es wurden Vergleichsversuche mit 7 anderen Verfahren (Autoanalyzer, vollenzymatisches Verfahren, Beckman-Creatinine-Analyzer, Boehringer-Test kinetisch mit und ohne Enteiweißung, Fullererde-Verfahren, HPLC-Methode) durchgeführt und die Einzelergebnisse von 106 Seren einem statistischen Methodenvergleich unterzogen. Die Berechnung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Medizinischen Hochschule Hannover nach dem Statistik-Programm-System für die Sozialwissenschaften (SPSS). Die Verteilung der nach jeweils einer Vergleichsmethode und dem Enzym-Jaffé-Farbtest ermittelten Werte wurde in Streuungsdiagrammen dargestellt und die berechnete und die ideale Regressionsgerade eingezeichnet. An statistischen Daten wurden der Pearson'sche Korrelationskoeffizient und das Bestimmtheitsmaß zur Beurteilung des Zusammenhangs zweier Methoden angegeben, ferner Mittelwert, Median, Spannweite, Minimum und Maximum für jede Methode. Die Auswertung ergibt, daß der Enzym-Jaffé-Farbtest mit allen geprüften Verfahren korreliert, die Korrelationskoeffizienten liegen zwischen 0,9723 und 0,9855 (n = 106). Die Übereinstimmung ist umso besser, je spezifischer die jeweilige Vergleichsmethode ist.
Die Variationskoeffizienten bei der Bestimmung von Kreatinin in Serie betrugen

3,36% ($\bar{x}$ = 0,93 mg/100ml $\hat{=}$ 82 µmol/l; n = 10)
2,27% ($\bar{x}$ = 2,05 mg/100ml $\hat{=}$ 181 µmol/l; n = 20)
2,11% ($\bar{x}$ = 4,85 mg/100ml $\hat{=}$ 429 µmol/l; n = 13)

und bei der Bestimmung von Tag zu Tag (an 20 aufeinanderfolgenden Tagen)

3,19% ($\bar{x}$ = 2,05 mg/100ml $\hat{=}$ 181 µmol/l).

Die Präzision des neuen Tests ist mit der der enzymatischen Methode nach Wahlefeld vergleichbar, Probenvolumen und Analysendauer sind jedoch im Enzym-Jaffé-Farbtest deutlich reduziert.
Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, die Eignung des Enzym-Jaffé-Farbtests für Bestimmungen im Urin zu prüfen. Es ergab sich eine gute Korrelation zur "Methode Merck", einem kinetischen Verfahren (Korrelationskoeffizient 0,9924). Die Werte nach dem neuen Test lagen allerdings um ca. 7% niedriger, denn bei dem kinetischen Verfahren wird der Einfluß von Chromogenen nicht vollständig ausgeschlossen, wie anhand weiterer Versuche bewiesen werden konnte.

Ferner war zu untersuchen, ob sich das im DIN-Entwurf 58 973 vorgeschlagene Verfahren zur Bestimmung von Kreatinin im Serum (Jaffé-Reaktion nach Adsorption des Kreatinins an Fullererde) weiter optimieren läßt. Bei Anwendung der Jaffé-Reaktion in der Modifikation nach M.Schmid für die quantitative Auswertung kann zwar die Empfindlichkeit gesteigert werden, zusätzliche Pipettierschritte sowie die Zeit- und Temperaturabhängigkeit dieser Modifikation sprechen gegen eine Änderung des bestehenden DIN-Entwurfes.
Auf Grund dieser Ergebnisse wurde, basierend auf dem Enzym-Jaffé-Farbtest, ein neuer DIN-Entwurf entwickelt und dem DIN-Ausschuß zur Prüfung vorgelegt.

7. Literaturverzeichnis

1) R.Helger, H.Rindfrey und J.Hilgenfeldt, Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 12, 344(1974)
2) R.Richterich, Klinische Chemie, Verlag S.Karger AG, Basel, 4.Auflage 1978
3) E.Knoll und H.Wisser, Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 11, 411(1973)
4) Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, Thieme-Verlag, Stuttgart, 7.Auflage 1976
5) G.Szasz und U.Börner, Clin.Chem. 23, 1172(1977)
6) J.Schirrmeister, E.Lang und N.K.Man, Med.Klin.(München) 64, 1314(1969)
7) M.Jaffé, Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 10, 391(1886)
8) J.A.Owen, B.Iggo, F.J.Scandrett und C.P.Stewart, Biochem.J. 58, 426 (1954)
9) E.Knoll und D.Stamm, Z.Klin.Chem. Klin.Biochem. 8, 582(1970)
10) R.Zender und A.Falbriard, Clin.Chim.Acta 12, 183(1965)
11) A.L.Chasson, H.J.Grady und M.A.Stanley, Amer.J.Clin.Pathol. 35, 83(1961)
12) Bedienungsanleitung zum Beckman-Creatinine-Analyzer
13) H.Bartels und M.Böhmer, Clin.Chim.Acta 32, 81(1971)
14) H.Popper, E.Mandel und H.Mayer, Biochem.Z. 291, 354(1937)
15) H.P.Seelig und H.Wüst, Ärztl.Lab. 15, 34(1969)
16) K.-A.Kovar, A.Ellinger und R.Seidel, Arch.Pharm. (Weinheim) 309, 603(1976)
17) M.Schmid, Dissertation, Tübingen 1978 und Veröffentlichung K.-A.Kovar und M.Schmid, Arch.Pharm.(Weinheim) 312, 780(1979)
18) DIN-Entwurf 58 973, Bestimmung von Kreatinin im Serum oder Plasma
19) R.Haeckel, J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 18, 385(1980)
20) G.A.Moss, R.J.L.Bondar und D.M.Buzzelli, Clin.Chem.(Winston-Salem,N.C.) 21, 1422(1975)
21) R.Dubos und B.F.Miller, J.Biol.Chem. 121, 429(1937)

22) B.F.Miller und R.Dubos, J.Biol.Chem. 121, 447(1937)
23) B.F.Miller und R.Dubos, J.Biol.Chem. 121, 457(1937)
24) B.F.Miller , M.J.C.Allinson und Z.Baker, J.Biol.Chem. 130, 383(1937)
25) M.H.Mc Lean, J.Gallwas und M.Hendrixon, Clin.Chem.(Winston-Salem,N.C.) 19, 623(1973)
26) H.Thompson und G.A.Rechnitz, Analytical Chemistry 46, 246(1974)
27) A.W.Wahlefeld, G.Holz und H.U.Bergmeyer in H.U.Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse II, Verlag Chemie, Weinheim, 3.Auflage 1974, S.1834
28) A.W.Wahlefeld, G.Herz und H.U.Bergmeyer, Scand.J.Clin. Lab.Invest. 29, 126(1972)
29) E.Munz, E.Bernt und A.W.Wahlefeld, Z.Klin.Chem.Klin. Biochem. 12, 259(1974)
30) J.Schirrmeister, H.Willmann und H.Kiefer, Klin.Wochenschr. 41, 878(1963)
31) H.U.Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse I, Verlag Chemie, Weinheim, 3.Auflage 1974, S.472
32) Dtsch.Ärzteblatt 68, 2228(1971)
33) J.D.Kruse-Jarres, Klinische Chemie I, Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart, 1.Auflage 1979
34) C.L.Lim, W.Richmond, D.P.Robinson und S.S.Brown, J.Chromatogr. 145, 41(1978)
35) P.Beutel, H.Küffner und W.Schubö, SPSS 8, Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart, 3.Auflage 1980
36) L.Sachs, Angewandte Statistik, Springer-Verlag, 5.Auflage 1978
37) E.Henkel, A.Kokenge und H.Meier Fresenius Z.Anal.Chem. 301, 175(1980)
38) Persönliche Mitteilung von F.G.Weyer, Hannover
39) K.-A.Kovar und G.Löhberg, Arch.Pharm.(Weinheim) 313, 893(1980)
40) H.Bartels, M.Böhmer und C.Heierli, Clin.Chim.Acta 37, 193(1972)
41) Beipackzettel Merckotest^{R} Kreatinin

Lebenslauf

Geboren:	am 10.Oktober 1954 in Münster
Eltern:	Helmut Löhberg, Diplom-Landwirt und Helga Löhberg, geb. Mertens, Landwirtschaftliche Lehrerin

Schulischer Werdegang

Grundschule:	Volksschule am Markt Lübbecke April 1961 bis März 1965
Gymnasium:	Wittekind-Gymnasium Lübbecke April 1965 bis Mai 1973
Reifeprüfung:	15.Mai 1973

Beruflicher Werdegang

Studium:	Westfälische Wilhelms-Universität Münster WS 73/74 Mathematik, Chemie, Physik SS 74 - WS 77/78 Pharmazie
Apothekenpraktikum:	Sofien-Apotheke Stuttgart 1.November 1977 bis 30.April 1978
1.Staatsexamen:	19.März 1976
2.Staatsexamen:	14.Oktober 1977
3.Staatsexamen:	10.November 1978
Approbation:	23.November 1978
Beginn der vorliegenden Arbeit:	Mai 1978
Abschluß der Arbeit:	Januar 1981
Wiss.Hilfskraft:	1.Januar 1979 bis 15.September 1980
Wiss.Angestellte:	seit 15.September 1980

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Prof.Dr.K.-A.Kovar waren die Herren Professoren und Dozenten:

Chemie:	H.G.v.Schnering, Th.Kauffmann
Biologie:	E.Leistner, F.-J.Schnelle, H.Hörster
Physik:	H.Merz, W.Hellenthal (alle Münster)
Pharm.Chemie:	H.Auterhoff (Tübingen), K.-E.Schulte, W.Meyer zu Reckendorf, J.Reisch, P.Rohdewald, G.Rücker
Pharm.Biologie:	H.Friedrich
Technologie, Biopharmazie:	Th.Eckert
Pharmakologie:	G.Bornmann
Hygiene, Mikrobiologie:	W.Ritzerfeld (alle Münster)